



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ
ΓΕΝΟΥΣ *COBITIS* ΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ ΚΑΡΛΑ**

**GENETIC SPECIES IDENTIFICATION OF
GENUS *COBITIS* OF LAKE KARLA**

ΚΕΤΣΕΤΖΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ



Cobitis stephanidisi



Cobitis vardarensis

ΛΑΡΙΣΑ 2015-2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2015-2016, υπό την επίβλεψη του κ.Ζ.Μαμούρη και την καθοδήγηση του διδάκτορα κ. Κ. Σταμάτη.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Μαμούρη Ζήση, καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών (Επιβλέπων)

Μούτου Αικατερίνη, αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Σταμάτη Κωνσταντίνο, Ε.ΔΙ.Π του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ζήση Μαμούρη κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την απεριόριστη στήριξή του. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή τους, για την επίλυση διαφόρων θεμάτων κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου και στη γιαγιά μου, οι οποίοι στήριζαν τις σπουδές μου με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωσή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	2
1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1.2 ABSTRACT.....	5
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
• 2.1 Πληθυσμιακή γενετική.....	6
• 2.2 Γενετική ποικιλότητα	6
2.2.1 Η πηγή της γενετικής ποικιλότητας.....	6
2.2.2 Η αύξηση της ποικιλότητας.....	6
2.2.3 Εξωτερικές πηγές ποικιλότητας.....	7
2.2.3.i Φυσική επιλογή	7
2.2.3.ii Γονιδιακή ροή	8
2.2.3.iii Γενετική παρέκκλιση	8
2.2.4 Ειδογένεση.....	9
• 2.3 Μορφολογικοί ή μοριακοί χαρακτήρες;	9
• 2.4 Πώς επιλέγω μοριακό δείκτη;.....	11
• 2.5 Μοριακοί δείκτες και φυλογένεση.....	12
2.5.i Το μιτοχονδριακό DNA ως μοριακός δείκτης.....	12
2.5.2 Κυτόχρωμα β.....	13
• 2.6 Λίμνη Κάρλα.....	14
2.6.i Γενικά στοιχεία - προβλήματα.....	14
2.6.ii Ιχθυοπανίδα της λιμνης Κάρλα.....	15
• 2.7 Ταξινόμηση.....	17
• 2.8 Γεωγραφική κατανομή.....	20
• 2.9 Γεωγραφική κατανομή των ψαριών του γένους <i>Cobitis</i> στον ελλαδικό χώρο.....	21
• 2.10 Οικολογία και συμπεριφορά.....	22
2.10.1 Ενδιαίτημα.....	22
2.10.2 Φυσική περιγραφή.....	22
2.10.4 Ηθολογικά χαρακτηριστικά.....	23

• 2.11 Απειλές.....	23
• 2.12 Πληθυσμός.....	24
• 2.13 Σκοπός.....	25
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
• 3.1 Δειγματοληψία - Βιολογικό υλικό.....	26
• 3.2 Επεξεργασία δειγμάτων.....	26
• 3.3 Εξαγωγή γενετικού υλικού.....	26
• 3.4 Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του DNA.....	28
• 3.5 Ενίσχυση μιτοχονδριακού γονιδίου, Κυτοχρώματοςb (cytb) με PCR.....	28
• 3.6 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	30
• 3.7 Καθαρισμός των PCR προϊόντων.....	31
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
• 4.1 Ηλεκτροφόρηση DNA.....	33
• 4.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.....	33
• 4.3 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας SSCP.....	34
• 4.4 Αλληλούχηση.....	35
• 4.5 Ταυτοποίηση αλληλουχιών-ειδών.....	36
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λίμνη Κάρλα που αποξηράνθηκε στα τέλη του 1962 αποτελούσε ένα ιδιαίτερα σημαντικό υδροβιότοπο όχι μόνο για την Ελλάδα, αλλά και για τα Βαλκάνια. Στις μέρες μας γίνεται προσπάθεια ανασύστασης της λίμνης καθώς και της ιχθυοπανίδας και της βλάστησής της. Στην προσπάθεια αυτή συμβάλλει το γεγονός ότι ο γόνος των ψαριών ζει έως 100 χρόνια. Τα είδη του γένους *Cobitis* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και γενετική ποικιλότητα επειδή δεν διαφέρουν μόνο σε επίπεδο είδους, αλλά και ενδοειδικά. Η συστηματική όμως ταξινόμηση αυτών, όσον αφορά τη λίμνη Κάρλα, είναι ανεπαρκής. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συμβολή στην κάλυψη αυτού του κενού, με τη γενετική ανάλυση 12 δειγμάτων ιχθύων του γένους *Cobitis* από τη λίμνη Κάρλα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με PCR-SSCP ενός τμήματος του γονιδίου, κυτοχρώματος β (*cytb*). Από την ανάλυση προέκυψε ότι το τμήμα αυτό παρουσιάζει αυξημένη γενετική ποικιλομορφία τόσο διαειδικά, όσο και ενδοειδικά. Επίσης, όπως φάνηκε μετά την ταυτοποίησή τους, 10 από τα 12 ψάρια άνηκαν στο είδος *Cobitis stephanidisi* και 2 στο είδος *Cobitis vardarensis*. Επιπλέον, παρόλο που τα αρχικά αποτελέσματα δίνουν μια μικρή ένδειξη μεγαλύτερης ποικιλομορφίας στο είδος *Cobitis vardarensis* σε σχέση με το *Cobitis stephanidisi*, η συλλογή και μελέτη περισσότερων δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη για τη στοιχειοθέτηση μιας τέτοιας υπόθεσης.

1.2 ABSTRACT

Lake Karla was a particularly important wetland not only for Greece but also for the Balkans and was drained at the end of 1962. Nowadays there is an effort to reconstruct the lake, and both fish fauna and flora. In this effort contributes the fact that the fish spawn lives up to 100 years. *Cobitis* are of particular interest, concern and complexity because they do not differ only at the species level, but also intraspecifically. The taxonomy of spined loaches in the Lake Karla's catchment is insufficiently known. The aim of this study was to fill this gap by providing genetic analyses of 12 samples of fish of genus *Cobitis* that were collected from Lake Karla's reservoir. A fragment of mitochondrial gene, cytochrome b (*cytb*), was subjected to PCR-SSCP analysis. Analysis showed that this part of *cytb* sequence show increased genetic diversity both interspecific and intraspecific. Also, 10 of 12 fish were identified as *Cobitis stephanidisi* and 2 were identified as *Cobitis vardarensis*. Although our results indicate a higher level of polymorphism in *Cobitis vardarensis* compared with *Cobitis stephanidisi*, further studies are necessary in order to support this theory.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Πληθυσμιακή γενετική

Η πληθυσμιακή γενετική είναι εκείνος ο κλάδος της γενετικής, ο οποίος μελετά τη γενετική σύσταση των βιολογικών πληθυσμών, δηλαδή τους τύπους και τις συχνότητες των γονιδίων και των γενοτύπων που τους αντιπροσωπεύουν, καθώς και τους μηχανισμούς (φυσική επιλογή, μεταλλάξεις, γενετική παρέκκλιση, γονιδιακή ροή) οι οποίοι μεταβάλλουν την γενετική δομή των πληθυσμών. Πρόκειται για έναν κλάδο ο οποίος είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την εξέλιξη και αποτελεί τη βάση για την γενετική βελτίωση των οργανισμών, ενώ όπως προδίδει το όνομά του, έχει μια προοπτική με κέντρο τον πληθυσμό, παρά το άτομο.

2.2 Γενετική ποικιλότητα

2.2.1 Η πηγή της γενετικής ποικιλότητας

Από τη στιγμή της σύλληψης της ιδέας της εξέλιξης, η μελέτη της έχει συνδεθεί στενά με τη μελέτη της κληρονομικότητας. Από τις σημαντικότερες αρχές της κληρονομικότητας είναι η αρχή της μονόδρομης ροής πληροφοριών από το γενότυπο στο φαινότυπο και η αρχή της διατήρησης της ταυτότητας των μονάδων της κληρονομικότητας από γενιά σε γενιά. Η κληρονομικότητα είναι μια συντηρητική δύναμη που παρέχει σταθερότητα στα βιολογικά συστήματα (Dobzhansky, 1970). Οι μοριακοί μηχανισμοί, όμως, που υπόκεινται στην επίδραση του περιβάλλοντος δεν μπορούν να είναι τέλει. Λάθη που συμβαίνουν στη διαδικασία της αντιγραφής παράγουν τροποποιημένες αλληλουχίες DNA (μεταλλάξεις) οι οποίες είναι δυνατόν να μεταβιβαστούν στις επόμενες γενιές. Δεν είναι εύκολο να δοθεί ένας ορισμός για τη μετάλλαξη. Συχνά ορίζεται ως μια αλλαγή στην αλληλουχία των ζευγών των βάσεων ενός γονιδίου (Futuyma, 1995). Κάποιες φορές όμως ο όρος χρησιμοποιείται με την ευρύτερη έννοια και για αλλαγές στον αριθμό και τη δομή των χρωμοσωμάτων, όπως είναι για παράδειγμα η πολυπλοειδία και οι χρωμοσωματικές αναδιατάξεις (π.χ. αναστροφή, μετατόπιση, έλλειμμα, διπλασιασμός).

2.2.2 Η αύξηση της ποικιλότητας

Η γενετική ποικιλότητα δεν προκύπτει μόνο από τις μεταλλάξεις αλλά και από τον γενετικό ανασυνδυασμό (διασκελισμός). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν δύο διεργασίες ανασυνδυασμού του γενετικού υλικού. Ο διαχρωμοσωματικός ανασυνδυασμός, που γίνεται με βάση τον ελεύθερο συνδυασμό των χρωμοσωμάτων, κατά τον οποίο τα μειωτικά προϊόντα του ανασυνδυασμού αποτελούν το 50% του συνόλου των απογόνων. Ο ενδοχρωμοσωματικός ανασυνδυασμός, που γίνεται με βάση το συνδυασμό

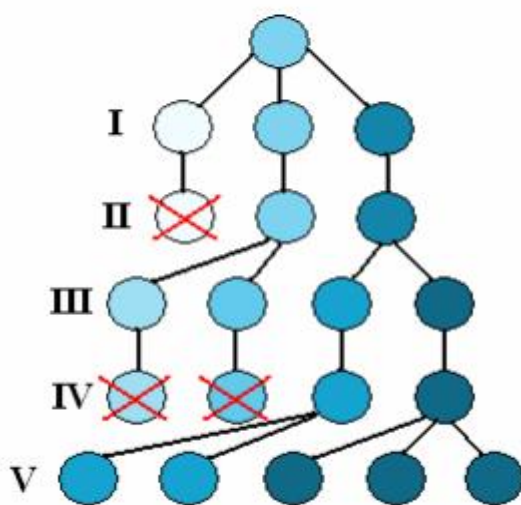
γονιδίων, συμβαίνει κατά τη μείωση ανάμεσα σε μη αδελφικά χρωματίδια και τα παραγόμενα μειωτικά προϊόντα του ανασυνδυασμού είναι λιγότερα από το 50% του συνόλου των απογόνων. Το ποσοστό τους, λοιπόν, κυμαίνεται από 0% έως 50%, κάτι που μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Τριανταφυλλίδης, 2001).

2.2.3 Εξωτερικές πηγές ποικιλότητας

Εκτός από τη γενετική ποικιλότητα που εμφανίζεται μέσα σε έναν πληθυσμό λόγω μεταλλάξεων και ανασυνδυασμού, υπάρχουν και εξωτερικές πηγές ποικιλότητας, όπως είναι η φυσική επιλογή, η γονιδιακή ροή και η γενετική παρέκκλιση.

2.2.3.i Φυσική επιλογή

Σύμφωνα με το Δαρβίνο, η εξέλιξη προχωρά κατά κύριο λόγο βάσει της δράσης της φυσικής επιλογής. Στην απλούστερή της μορφή, δηλώνει το γεγονός ότι αναπαραγόμενες μονάδες (αλληλόμορφα, γενότυποι, πληθυσμοί ή και είδη) που εμφανίζουν γενετικές διαφορές έχουν διαφορετικές πιθανότητες αντιπροσώπευσής τους στις επόμενες γενιές. Αν κάποια από τα χαρακτηριστικά τους έχουν μεγαλύτερη καταλληλότητα ως προς το περιβάλλον, βοηθούν δηλαδή την επιβίωση και την αναπαραγωγή, τότε τα χαρακτηριστικά αυτά θα έχουν αυξημένη αντιπροσώπευση στην επόμενη γενιά. Αν, μάλιστα, η συγκεκριμένη φυσική επιλογή συνεχιστεί για πολλές γενιές, τα χαρακτηριστικά αυτά θα αποτελέσουν ιδιαίτερο γνώρισμα του είδους (Εικόνα 1).



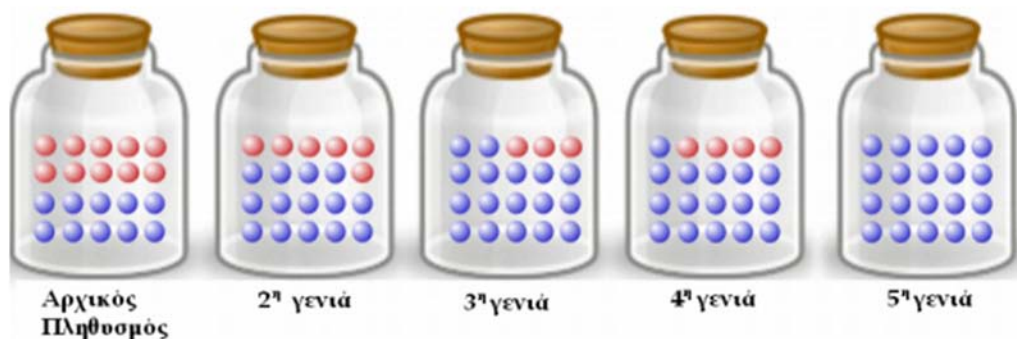
Εικόνα 1: Σχηματική απόδοση της δράσης της φυσικής επιλογής σε έναν πληθυσμό, όπου τα άτομα που φέρουν το σκούρο χρώμα ευνοούνται. I) Μέσω μετάλλαξης δημιουργούνται νέα αλληλόμορφα. II) Τα άτομα που φέρουν τις δυσμενείς μεταλλάξεις απομακρύνονται από τον πληθυσμό. III) Ακολουθεί αναπαραγωγή των ατόμων, ενώ ταυτόχρονα έχουμε και νέες μεταλλάξεις. IV) Τα άτομα που φέρουν τις ευνοϊκές μεταλλάξεις έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να επιβιώσουν. V) Τα άτομα που επιβιώνουν συνεχίζουν να αναπαράγονται.

2.2.3.ii Γονιδιακή ροή

Η γονιδιακή ροή περιγράφει την είσοδο στη γενετική δεξαμενή ενός πληθυσμού, αλληλομόρφων από έναν ή περισσότερους άλλους πληθυσμούς. Συνήθως οι πληθυσμοί αυτοί ανήκουν στο ίδιο είδος, σε μερικές περιπτώσεις, όμως, γίνεται υβριδισμός ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, τα οποία δεν είναι πλήρως αναπαραγωγικά απομονωμένα. Η ποικιλότητα που προέρχεται από υβριδισμό συχνά υπερβαίνει την εσωτερική ποικιλότητα καθενός από τα γονικά είδη. Κάποιες φορές ο υβριδισμός είναι δυνατόν να δώσει γενετική ποικιλότητα επαρκή για προσαρμογή σε περιβάλλοντα που φυσιολογικά θα ήταν απρόσιτα για ένα είδος. Η γονιδιακή ροή λαμβάνει χώρα είτε με μετακίνηση ατόμων μεταξύ δύο πληθυσμών, όπως μέσω της μετανάστευσης, είτε με μεταφορά γαμετών. Αποτελεί συντηρητικό παράγοντα που αποτρέπει την απόκλιση μερικώς απομονωμένων πληθυσμών και συμβάλλει σημαντικά στη σταθερότητα των διαδεδομένων ειδών και τη στάση των πολυπληθών ειδών. Διαφέρει ανάλογα με τον πληθυσμό και το είδος και μειώνει τις διαφορές των γενετικών δεξαμενών.

2.2.3.iii Γενετική παρέκκλιση

Με τον όρο γενετική παρέκκλιση αναφερόμαστε στις τυχαίες αλλαγές στις συχνότητες των αλληλομόρφων, συνήθως λόγω της τυχαίας δειγματοληψίας από τη γενετική δεξαμενή κάποιου πληθυσμού κατά τη μεταβίβαση από τη μια γενιά στην άλλη (Εικόνα 2). Πρόκειται για πολύ σημαντική εξελικτική διεργασία, η οποία οδηγεί σε αλλαγές των αλληλικών συχνοτήτων με το πέρασμα του χρόνου. Μπορεί να συμβάλει στην πλήρη εξάλειψη κάποιων αλληλομόρφων, με συνέπεια την ελάττωση της γενετικής ποικιλότητας. Σε αντίθεση με τη φυσική επιλογή, όπου η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων εξαρτάται από την αναπαραγωγική τους επιτυχία, οι αλλαγές δεν καθοδηγούνται από την περιβαλλοντική ή την προσαρμοστική πίεση και μπορεί να αποδειχθούν ευεργετικές, ουδέτερες, ή καταστρεπτικές για την αναπαραγωγική επιτυχία. Ο αντίκτυπος της γενετικής παρέκκλισης είναι μεγαλύτερος στους μικρούς πληθυσμούς και μικρότερος στους μεγάλους πληθυσμούς.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της τυχαίας δειγματοληψίας και της γενετικής παρέκκλισης.

2.2.4 Ειδογένεση

Με τον όρο ειδογενετική πορεία ή ειδογένεση προσδιορίζεται η εξελικτική διαδικασία κατά την οποία ένας πληθυσμός αποκλίνει και σχηματίζει διαφορετικούς και καινούργιους κλάδους, ώσπου τελικά δημιουργούνται διαφορετικά είδη (Staley et al, 2009). Στη διαδικασία λοιπόν προσαρμογής των πληθυσμών στις μεταβολές του περιβάλλοντος, μπορεί να υπάρξουν αλλαγές στη γενετική τους δομή, με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί να εκδηλώνουν διαφορές στη μορφολογία και τη φυσιολογία τους. Όταν οι αλλαγές αυτές φτάσουν σε σημείο που δεν είναι δυνατή η απόκτηση βιώσιμων και γόνιμων απογόνων (αναπαραγωγική απομόνωση), τότε πρόκειται για δημιουργία νέου είδους. Προϋπόθεση για την αλλαγή της γενετικής δομής των πληθυσμών είναι η απομόνωσή τους, η οποία μπορεί να είναι είτε γεωγραφική, είτε αναπαραγωγική. Φυσικές δομές, όπως βουνά, φαράγγια κ.ά., είναι πιθανό να λειτουργήσουν ως γεωγραφικά εμπόδια, τα οποία παρεμποδίζουν την ανταλλαγή γονιδίων ανάμεσα σε δύο πληθυσμούς. Έτσι, πληθυσμοί που ζουν χωριστά για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορούν να αναπτύξουν, λόγω της προσαρμογής τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα, αναπαραγωγική απομόνωση.

2.3 Μορφολογικοί ή μοριακοί χαρακτήρες;

Παλαιότερα η περιγραφή των σχέσεων μεταξύ των οργανισμών γινόταν με τη χρήση μεθόδων οι οποίες στηρίζονταν σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τη συγκριτική μορφολογία, τη φυσιολογία και άλλα. Οι μέθοδοι ανάλυσης των χαρακτήρων (που ονομάστηκαν κλαδιστικές μέθοδοι) βασίζονται εν γένει στις αρχές που περιγράφηκαν από το Γερμανό εντομολόγο Willi Hennig στο βιβλίο του *Phylogenetic Systematics* (1966). Εφόσον ήταν γνωστό ότι ο γενότυπος ενός ατόμου αντικατοπτρίζεται στο φαινότυπό του, οι μορφολογικοί χαρακτήρες ήταν εκείνοι που χρησιμοποιούνταν κατά κύριο λόγο στις κλαδιστικές μελέτες, γιατί έφεραν πληροφορίες που αντιστοιχούσαν σε μεγάλο μέρος του γενετικού υλικού. Επιπροσθέτως, ο φαινότυπος είναι εκείνος που υφίσταται τις πιέσεις της φυσικής επιλογής και εξελίσσεται ορατά. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης των μορφολογικών χαρακτήρων, είναι η δυνατότητα χρήσης μεγάλου δείγματος ατόμων στις αναλύσεις, μειώνοντας με τον τρόπο αυτόν την πιθανότητα στατιστικού σφάλματος, καθώς και η δυνατότητα επανάληψης των αναλύσεων με τη χρήση των ίδιων ατόμων, εφόσον είναι δυνατή η διατήρησή τους. Για τους παραπάνω λόγους, η χρήση της μορφολογίας βρισκόταν σε άνθιση μέχρι τη δεκαετία του '80. Οι αναλύσεις που στηρίζονται στη μορφολογία των ατόμων έχουν όμως και μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι οι διαφορετικοί χαρακτήρες είναι, κάποιες φορές, δύσκολο να διακριθούν, συνεπώς πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η υποκειμενικότητα του ερευνητή. Επίσης, είναι δυνατό τα μορφολογικά χαρακτηριστικά να συγκλίνουν ή να εξελίσσονται παράλληλα, γεγονός που δυσχεραίνει τον εντοπισμό ομοπλασιών (Moore & Willmer, 1997 και Conway, 2003), ενώ και τα πρότυπα της κληρονομικότητας των μορφολογικών χαρακτήρων δεν είναι πάντα σαφή. Υπάρχουν ακόμη, περιπτώσεις όπου το πλήθος των δεδομένων (διαθέσιμων χαρακτήρων) δεν επαρκεί για την καλή στήριξη των φυλογενετικών υποθέσεων.

Μια λύση στα προβλήματα αυτά έδωσε η ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή σε όλους τους οργανισμούς και σε κάθε μόριο το οποίο φέρει κάποια πληροφορία για τον οργανισμό, από το DNA μέχρι τις πρωτεΐνες. Με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), δόθηκε στους ερευνητές η δυνατότητα προσδιορισμού αλληλουχιών DNA σε μεγάλη κλίμακα, οπότε οι μοριακοί χαρακτήρες έγιναν αναπόσπαστο κομμάτι των φυλογενετικών αναλύσεων.

Η χρήση μοριακών δεικτών παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, τα κυριότερα εκ των οποίων περιγράφονται παρακάτω:

- ✦ Όταν μελετά κανείς το DNA, μελετά απευθείας το γενετικό υλικό, το οποίο έχει κληρονομηθεί από τους προγόνους. Το DNA των σύγχρονων οργανισμών προέρχεται από τους προγονικούς οργανισμούς, οπότε το DNA αντανακλά τη γενεαλογία και είναι αξιόπιστο για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων.
- ✦ Ένα από τα προβλήματα των μορφολογικών μελετών είναι το γεγονός ότι οι υπό μελέτη οργανισμοί μπορεί να μοιάζουν εξαιρετικά μεταξύ τους στη μορφολογία, με αποτέλεσμα οι ομοιότητες αυτές να καθιστούν δυσκολότερη την εύρεση ενός αριθμού χαρακτήρων, ικανού για αξιόπιστη συστηματική ανάλυση (Hillis & Wiens, 2000). Αντιθέτως, οι αλληλουχίες του DNA αποδείχθηκε ότι είναι ευμετάβλητες ανάμεσα στα είδη και κατά συνέπεια είναι δυνατό να βρεθεί μεγάλος αριθμός χαρακτήρων οι οποίοι φέρουν φυλογενετικά πληροφοριακή μεταβλητότητα.
- ✦ Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης του DNA μπορεί να είναι ο ρυθμός εξέλιξης των γονιδίων. Είναι πιθανό το ίδιο γονίδιο σε διαφορετικά είδη να εξελίσσεται με τον ίδιο ρυθμό. Αυτό όμως δεν έχει τεκμηριωθεί απόλυτα.

Οι καταλληλότερες λοιπόν, μελέτες όσον αφορά τη φυλογένεση βασίζονται σε συνδυασμό διαφορετικών ειδών δεδομένων. Είναι σαφές ότι οι μελέτες αυτές είναι πιο ολοκληρωμένες και είναι λιγότερο πιθανό να περιέχουν σφάλματα όσον αφορά τα συμπεράσματα που εξάγονται, ιδιαίτερα δε εάν αυτά συμφωνούν ανάμεσα σε διαφορετικά είδη αναλύσεων (Bininda- Emonds 2000). Δεν μπορούμε, όμως, να αμφισβητήσουμε τη συμβολή των μοριακών χαρακτήρων στη φυλογένεση και να επισκιάσουμε το σημαντικό ρόλο που έπαιξαν στη διαλεύκανση των φυλογενετικών σχέσεων ακόμα και μεταξύ ανώτερων ταξινομικών βαθμίδων, που παλαιότερα δεν ήταν δυνατό να γίνουν εύκολα γνωστές με τη βοήθεια των μορφολογικών χαρακτήρων, όπως για παράδειγμα η μοριακή ανάλυση σε επίπεδο φύλων του βασιλείου των ζώων με τη βοήθεια ριβοσωματικών και μιτοχονδριακών γονιδίων (Bourlat et al. 2008) και η μοριακή φυλογένεση εντός των Δευτεροστομίων με τη βοήθεια πρωτεϊνικών αλληλουχιών (Blair & Hedges 2005).

2.4 Πώς επιλέγω μοριακό δείκτη;

Η χρήση των μοριακών δεικτών είναι ευρέως διαδεδομένη μεταξύ των εξελικτικών βιολόγων και οι μέθοδοι ανάλυσης των γενετικών δεδομένων βελτιώνονται ταχύτατα. Στοιχεία της μοριακής εξέλιξης συνοψίζονται για να εξηγήσουν την προέλευση της μεταβλητότητας στο επίπεδο του DNA, τα όριά της, καθώς και τις σχέσεις που συνδέουν τη γενετική διαφοροποίηση με τις βιολογικές παραμέτρους των υπό μελέτη οργανισμών (Chenuil, 2006).

Οι μοριακοί δείκτες καθορίζονται από δύο συνιστώσες:

- ✦ Την περιοχή του DNA που πρόκειται να «καλύψουν» και
- ✦ Την τεχνική που χρησιμοποιείται για την εύρεση της διαφοροποίησης.

Τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου μοριακού δείκτη χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- ✦ Το επίπεδο της διαφοροποίησης.
- ✦ Τη φύση της πληροφορίας, η οποία πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με το επιστημονικό ερώτημα.
- ✦ Κάποια πρακτικά κριτήρια, τα οποία έχουν να κάνουν κυρίως με τον εξοπλισμό του εκάστοτε εργαστηρίου και την εμπειρία του ερευνητή.

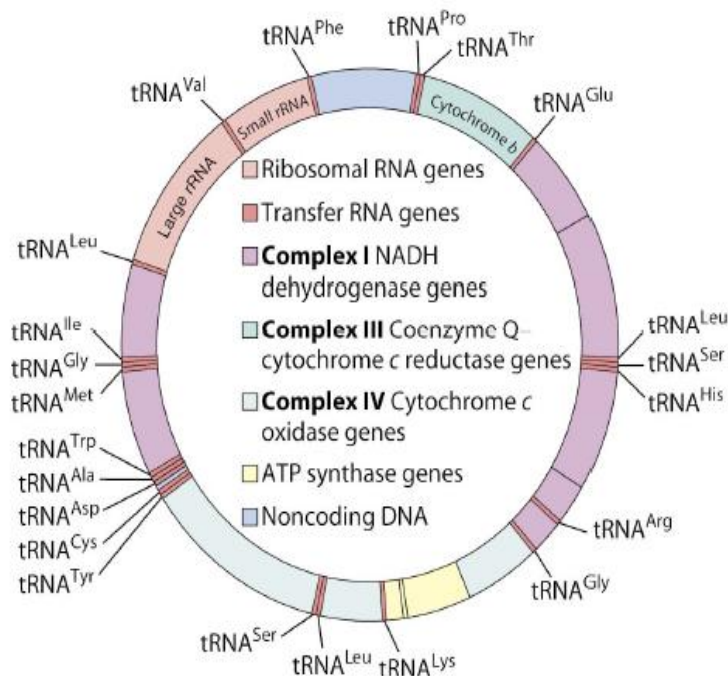
Επιπλέον, ο μοριακός δείκτης που επιλέγεται πρέπει να:

- ✦ είναι διακριτός και ευρέως εξαπλωμένος
- ✦ είναι εύκολος στην απομόνωση και την ανάλυση
- ✦ έχει απλή γενετική δομή
- ✦ έχει ξεκάθαρο τρόπο κληρονομής
- ✦ έχει γρήγορο ή αργό ρυθμό εξέλιξης, ανάλογα με τα είδη που μελετώνται
- ✦ έχει ποιοτικούς χαρακτήρες από τους οποίους να μπορούν να εξαχθούν φυλογενετικά συμπεράσματα.

2.5 Μοριακοί δείκτες και φυλογένεση

2.5.1 Το μιτοχονδριακό DNA ως μοριακός δείκτης

Η μελέτη της εξέλιξης συχνά απαιτεί την κατανόηση της ιστορίας του πληθυσμού, του είδους ή του κλάδου που μελετάται. Για να εξετασθεί η γενετική ποικιλότητα σε διαφορετικά περιβάλλοντα είναι απαραίτητη η γνώση της ιστορίας αποίκησης των διαφόρων πληθυσμών καθώς και η μεταξύ τους γονιδιακή ροή. Σε συγκριτικές αναλύσεις των διαδικασιών προσαρμογής ή της μοριακής εξέλιξης, αλλά και σε μελέτες βιογεωγραφίας, απαιτείται ο προσδιορισμός των σχέσεων ανάμεσα στα είδη. Η διαλεύκανση αυτών των σχέσεων βασίζεται, σε μεγάλο βαθμό, σε γενετικούς δείκτες (Hurst & Jiggins, 2005). Θεωρητικά, όλες οι περιοχές του DNA που διαφοροποιούνται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μελέτες πληθυσμιακής γενετικής ή γενικά σε ενδοειδικές ή διαειδικές μελέτες (Pleines et al., 2009), ωστόσο ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης, σε μελέτες στο ζωικό βασίλειο είναι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Πρόκειται για ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο μεγέθους ~16kb (στους περισσότερους πολυκύτταρους οργανισμούς). Οι δύο αλυσίδες του mtDNA είναι η βαριά (Heavy), η οποία είναι και η κυρίως μεταφραζόμενη αλυσίδα, και η ελαφριά (Light) (Bibb et al, 1981). Το ζωικό mtDNA περιέχει συνήθως 36-37 γονίδια, από τα οποία τα δύο κωδικοποιούν ριβοσωματικό RNA, τα 22 κωδικοποιούν tRNAs και τα υπόλοιπα 12 ή 13 κωδικοποιούν υπομονάδες των πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα και στη σύνθεση ATP (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Η δομή του μιτοχονδριακού DNA, όπου φαίνονται αναλυτικά η διάταξη των γονιδίων, καθώς και τα μόρια που κωδικοποιούν (Staley, 2009).

Επιπλέον, υπάρχει μία μη κωδικοποιούσα περιοχή που ορίζεται ως ρυθμιστική περιοχή εξαιτίας του ρόλου που έχει στην αντιγραφή και τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών μορίων. Τα εξώνια είναι συμπαγώς πακεταρισμένα, χωρίς ενδιάμεσα ιντρόνια. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν περιέχει ιστόνες, έχει περιορισμένη ικανότητα επιδιόρθωσης των λαθών κατά την αντιγραφή και ως εκ τούτου ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης είναι υψηλός (5-10 φορές υψηλότερος σε σχέση με το πυρηνικό γονιδίωμα) (Brown et al, 1979). Έτσι, το mtDNA εξελίσσεται έως και 10 φορές πιο γρήγορα από το μη επαναλαμβανόμενο πυρηνικό DNA, ενώ ο εξελικτικός ρυθμός είναι διαφορετικός ακόμα και ανάμεσα σε διαφορετικά τμήματα του. Το mtDNA εμφανίζεται σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων στα κύτταρα, είναι πλήρως χαρακτηρισμένο, ενώ ο μητρικός τρόπος κληρονομικότητας (Zhao et al, 2004) δεν αφήνει περιθώρια για ανασυνδυασμό, με ελάχιστες εξαιρέσεις (Rokas et al, 2003). Η «επιτυχία» του mtDNA στις φυλογενετικές μελέτες οφείλεται, εκτός από τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά και την έλλειψη ανασυνδυασμού (Clayton, 1992 και Hayashi et al, 1985) και στην εύκολη απομόνωση του (Michaels et al, 1982 και Robin & Wong, 1988), ενώ δεν είναι απαραίτητη μεγάλη ποσότητα ιστού. Επιπρόσθετα, το mtDNA διαφόρων taxa μπορεί να πολλαπλασιαστεί με ευκολία τόσο εξαιτίας του μικρού του μεγέθους όσο και της ύπαρξης πληθώρας παγκόσμιων εκκινήτων για αρκετούς γενετικούς τόπους.

Ο υψηλός εξελικτικός ρυθμός του mtDNA, σε συνδυασμό με το μικρό δραστικό μέγεθος του, το οποίο είναι περίπου το ένα τέταρτο σε σχέση με αυτό των πυρηνικών δεικτών, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού πρόσφατων εξελικτικών γεγονότων (Hurst & Jiggins, 2005). Δεν είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της αλληλουχίας όλων των μεταφραζόμενων τμημάτων του mtDNA σε μία μελέτη, ώστε να εξαχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα. Έχει δειχθεί ότι 8.8 kilobases (kb), που αποτελούν σχεδόν το μισό της αλληλουχίας της μεταφραζόμενης περιοχής, έχει τον ίδιο βαθμό διαφοροποίησης συγκριτικά με ολόκληρη την περιοχή (Silva et al., 2002). Ωστόσο, έχουν γίνει λίγες μελέτες με στόχο τον προσδιορισμό των πιο πληροφοριακών, για φυλογενετικές μελέτες, τμημάτων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Αξίζει να αναφερθεί ότι σημαντική μείωση στον επιτυχή προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων παρατηρήθηκε όταν είχαν αφαιρεθεί τμήματα των γενετικών τόπων για το 12S rRNA, μέρος του 16S rDNA και το μεγαλύτερο τμήμα των γονιδίων ND4 (υπομομάδα 4 της αφυδρογονάσης του δινουκλεοτιδίου του νικοτιναμιδίου-αδενίνης, NADH dehydrogenase 4) και ND5, ND6 και cyt b (κυτόχρωμα b).

Συνεπώς, ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης που παρατηρείται ανάμεσα στις διαφορετικές περιοχές του mtDNA έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση διαφορετικών τμημάτων, ως δεικτών στις εκάστοτε φυλογενετικές μελέτες.

2.5.2 Κυτόχρωμα β

Το γονίδιο του κυτοχρώματος β (cytb) είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα σε φυλογενετικές μελέτες. Εξαιτίας του σχετικά αργού ρυθμού εξέλιξής του, το cytb έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα σε διάφορα

taxa (Meyer et al, 1990), ενώ σύμφωνα με τους Hillis & Moritz (1990) και Hoelzel (1992) εμφανίζει αρκετή ποικιλότητα στην αλληλουχία του ώστε να αποτελεί χρήσιμο δείκτη για την εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων στα ψάρια και σε άλλα σπονδυλωτά, τόσο σε ενδοειδικό επίπεδο, αλλά και εντός του γένους και των οικογενειών. Επίσης, η διαθεσιμότητα παγκόσμιων εκκινητών για το συγκεκριμένο τμήμα δίνει τη δυνατότητα της μελέτης του στα περισσότερα, αν όχι σε όλα, τα ζωικά φύλα (Zhang & Hewitt, 1997).

2.6 Λίμνη Κάρλα

2.6.i Γενικά στοιχεία - προβλήματα

Η **λίμνη Κάρλα**, ή λίμνη **Βοιβήδα** (παλαιότερα) και κατά την αρχαιότητα Βοιβής, ή Βοιβιάς, ή Βοίβη, ή λίμνη της Πελασγιώτιδος, ήταν λίμνη η οποία αποξηράνθηκε το 1962, επειδή την εποχή εκείνη προκαλούσε πλημμύρες στις πέριξ γεωργικές καλλιέργειες, ενώ ορισμένες βαλτώδεις εκτάσεις γύρω της προκαλούσαν την έντονη παρουσία εντόμων. Βρισκόταν νοτιοανατολικά της Λάρισας, κοντά στις βόρειες πλαγιές του Πηλίου, στα όρια των Νομών Λαρίσης και Μαγνησίας.

Η αποξήρανση της λίμνης Κάρλα άρχισε στο τέλος Αυγούστου του 1962 με τα εγκαίνια της σήραγγας μήκους 10.150 μέτρων και ήταν από τα σημαντικότερα έργα για την ανάπτυξη της ελληνικής γεωργίας. Αποδόθηκαν 80.000 στρέμματα καλλιεργήσιμης γης στους αγρότες της Θεσσαλίας, σε μία εποχή που η ελληνική γεωργία πραγματοποιούσε τα πρώτα βήματά της προς την εκβιομηχάνιση αλλά και την αντιμετώπιση του ευρωπαϊκού ανταγωνισμού. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι οι επιπτώσεις στο οικοσύστημα της περιοχής ήταν μεγαλύτερες από το όφελος που προσέφερε η αποξήρανσή της. Έτσι, σήμερα γίνεται προσπάθεια για αναδημιουργία της λίμνης, που θα έχει μέγεθος 38.000 στρέμματα. Η αρχική λίμνη είχε μέγεθος 180-195 χιλιάδες στρέμματα και το βάθος της έφτανε τα 4-6 μ. Το Δεκέμβριο του 2010 άρχισε η άντληση νερού από τον ποταμό Πηνειό, ενώ όταν τεθούν σε πλήρη λειτουργία τα πέντε αντλιοστάσια του Πηνειού θα τροφοδοτούν τη λίμνη με 14 κυβικά μέτρα νερού το δευτερόλεπτο. Το έργο αναμένεται να συμβάλλει μεταξύ άλλων στην αντιπλημμυρική προστασία, την αποκατάσταση του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα, την άρδευση 100.000 στρεμμάτων, την ενίσχυση της ύδρευσης της πόλης του Βόλου με 15 εκατ. κυβικά μέτρα νερού ετησίως - το 50% των αναγκών της πόλης.

Κατά τη διάρκεια των εργασιών για την ανασύσταση της λίμνης ήρθαν στο φως σημαντικά αρχαιολογικά ευρήματα (ενδεικτικά: κοσμήματα, αγγεία, νομίσματα, κλίβανοι, υπολείμματα κτιρίων, αγωγοί, τάφοι). Το υπουργείο Πολιτισμού αποφάσισε μάλιστα τη διατήρηση και μετατροπή σε επισκέψιμο αρχαιολογικό χώρο, ενός τμήματος προϊστορικού οικισμού, έκτασης 3.5 στρεμμάτων, του τέλους της Νεολιθικής Εποχής.

2.6.ii Ιχθυοπανίδα της λιμνης Κάρλα

Οι τελευταίες μελέτες που διεξήχθησαν από το φορέα διαχείρισης της περιοχής οικοανάπτυξης Κάρλα-Μαυροβουνίου-Κεφαλόβρυσσου-Βελεστίνου έδειξαν ότι η ιχθυοπανίδα της αριθμεί 7 αυτόχθονα είδη και 3 εισαγωγής.

Πίνακας 1: Κατάλογος ειδών ιχθυοπανίδας της Οδηγίας 92/43/ΕΟΚ προς εποπτεία από τον Φ.Δ.Π.Ο.Κα.Μα.Κε.Βε., των εσωτερικών υδάτων της Π.Ο. Κα.Μα.Κε.Βε., κωδικοί ειδών για την Οδηγία, ονομασία ειδών στην Οδηγία, εναλλακτική ονομασία, κατάσταση διατήρησής τους, ενδημισμός και βιογεωγραφική ζώνη μελέτης.

	Είδος	Είδος (Παράρτημα Οδ. 92/43)	Εναλλακτική Ονομασία (Οδ. 92/43)	Κόκκινο βιβλίο 2009	IUCN	Ενδημι- σμός	Βιογεωγρ. Ζώνη
<i>Clupeidae</i>							
1	<i>Alosa fallax</i> (Lacepede, 1803)	<i>Alosa spp.</i>		DD	LC		MED
<i>Cyprinidae</i>							
2	<i>Rhodeus amarus</i> (Bloch, 1782)	<i>Rhodeus sericeus amarus</i>	<i>Rhodeus sericeus amarus</i>	LC	LC		MED
3	<i>Barbus sperchiensis</i> (Stephanidis, 1950)	<i>Barbus plebejus</i>		NT	NT	E	MED
<i>Cobitidae</i>							
4	<i>Cobitis stephanidisi</i> (Economidis & Nalbant, 1997)	<i>Cobitis taenia</i>		CR	CR	E	MED
5	<i>Cobitis vardarensis</i> (Karaman, 1928)	<i>Cobitis taenia</i>		LC	LC	(E)	MED

* DD: Ανεπαρκώς γνωστά, LC: Μειωμένου ενδιαφέροντος, NT: Σχεδόν απειλούμενα, CR: Κρισίμως κινδυνεύοντα

* Ως προς τον ενδημισμό των ειδών με E αναφέρονται όλα τα είδη που είναι αποκλειστικά ενδημικά της Ελληνικής επικράτειας, ενώ με (E) αναφέρονται τα είδη που είναι "σχεδόν ενδημικά" - απαντούν δηλαδή και σε πολύ περιορισμένη χωρική έκταση στα διασυνοριακά λιμναία ή ποτάμια συστήματα που μοιράζεται η Ελλάδα με άλλες Βαλκανικές χώρες.

* MED: ηπειρωτική γεωγραφική ζώνη

Αποτελέσματα παρακολούθησης Ταμιευτήρα Κάρλα:

- Συνολικά καταγράφηκαν 9 είδη ψαριών [2 ενδημικά του Πηνειού (*Alburnus thessalicus*, *Knipowitschiathessala*) και 2 ξενικά (*Lepomis gibbosus*, *Gambusia holbrooki*)] καθώς και άτομα του γένους *Cobitis* sp. [ενδεχόμενα πρόκειται για το *Cobitis vardarensis* ενδημικό του Πηνειού ή για το ενδημικό *Cobitis stephanidisi* του κεφαλόβρυσου Βελεστίνου (κρίσιμως κινδυνεύον)], όπως φαίνεται στο πίνακα 2.
- Από το αλίευμα της παρούσας έρευνας απουσίαζαν ορισμένα είδη [*Tinca tinca* (γλίνι), *Anguilla Anguilla* (χέλι), *Chondrostoma vardarensis* (γουρουνομύτης)] για τα οποία υπήρχε αναφορά στο δημοσίευμα του Ananiades (1956) για την τέως Λίμνη Κάρλα.
- Στο συνολικό αλίευμα ήταν υψηλή η συμμετοχή των παμφάγων ειδών με απουσία των ιχθυοφάγων ειδών.

Πίνακας 2: Είδη ψαριών που καταγράφηκαν στο Ταμιευτήρα της λίμνης Κάρλα.

Είδος	Αριθμός
<i>Alburnus thessalicus</i>	2007
<i>Carassius gibelio</i>	41
<i>Cobitis sp.</i>	45
<i>Cyprinus carpio</i>	92
<i>Gambusia holbrooki</i>	97
<i>Knipowitschia thessala</i>	12
<i>Lepomis gibbosus</i>	579
<i>Rutilus rutilus</i>	53
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	107

2.7 Ταξινόμηση

Γναθοστόματα ονομάζονται τα σπονδυλωτά που διαθέτουν σιαγόνες. Ο όρος προέρχεται από την ελληνική: γνάθος (gnathos) "σαγόني" + στόμα (stoma) "στόμα". Στα γναθοστόματα περιλαμβάνονται περίπου 60.000 είδη, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 99% όλων των ζωντανών σπονδυλωτών. Εκτός από τις αντίθετες σιαγόνες, επίσης έχουν δόντια, ζευγαρωτές αποφύσεις και ένα οριζόντιο ημικυκλικό κανάλι στο εσωτερικό του αυτιού, μαζί με άλλα φυσιολογικά και κυτταρικά ανατομικά χαρακτηριστικά όπως τα περιβλήματα μυελίνης των νευρώνων. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που διαθέτουν είναι το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα που μέσω των ανασυνδυασμών στις V (D) J περιοχές του αντισώματος, δημιουργεί θέσεις αναγνώρισης αντιγόνου, αντί να χρησιμοποιεί γενετικό ανασυνδυασμό στη μεταβλητή περιοχή του γονιδίου του υποδοχέα του λεμφοκυττάρου (Cooper & Alder, 2006). Τα Γναθοστόματα αποτελούν μια υπερκλάση, που χωρίζεται σε τρεις κύριες ομάδες: τους Χονδρυχθίες (*Chondrichthyes*), τα Πλακόδερμα (*Placodermi*), μια εξαφανισμένη ομάδα θωρακισμένων ψαριών και τα Τελεόστομα (*Teleostomi*), το οποίο περιλαμβάνει τις γνωστές κατηγορίες των οστεώδων ψαριών (οστεϊχθίες), πουλιών, θηλαστικών, ερπετών και αμφιβίων.

Οι Οστεϊχθίες, που αναφέρονται και γενικά ως οστεώδη ψάρια, είναι μια ποικιλόμορφη ταξινομική ομάδα ψαριών που ο σκελετός τους αποτελείται κυρίως από ιστό οστών, και όχι από χόνδρο. Η συντριπτική πλειοψηφία των ψαριών ανήκουν στους Οστεϊχθίες, η οποία είναι μια εξαιρετικά ποικιλόμορφη και πλούσια ομάδα που αποτελείται από 45 τάξεις και πάνω από 435 οικογένειες και 28.000 είδη και αποτελεί τη μεγαλύτερη κλάση σπονδυλωτών που υπάρχει σήμερα. Η ομάδα των Οστεϊχθίων χωρίζεται σε ψάρια με ακτινωτά πτερύγια (*Actinopterygii*) και σε ψάρια με λοβωτά πτερύγια (*Sarcopterygii*). Τα αρχαιότερα γνωστά απολιθώματα οστεωδών ψαριών είναι περίπου 420 εκατομμύρια χρόνια πριν, τα οποία επιπλέον είναι μεταβατικά απολιθώματα, που παρουσιάζουν ένα πρότυπο οδοντοστοιχίας που είναι ανάμεσα μεταξύ των σειρών δοντιών των καρχαριών και των οστεωδών ψαριών.

Τα Ακτινοπτερύγια (*Actinopterygii*), ή ψάρια με ακτινωτά πτερύγια, αποτελούν μια υποκατηγορία των Οστεϊχθίων. Τα ψάρια με ακτινωτά πτερύγια, ονομάζονται έτσι επειδή διαθέτουν λεπιδοτρίχια ή αλλιώς «ακτινωτά πτερύγια». Τα πτερύγια τους είναι ιστοί δέρματος που υποστηρίζονται από οστεώδη ή κεράτινα αγκάθια («ακτίνες»), σε αντίθεση με τα σαρκώδη, λοβωτά πτερύγια που χαρακτηρίζουν την κατηγορία των Σαρκοπτερυγίων (*Sarcopterygii*) που επίσης, όμως, έχουν λεπιδοτρίχια. Αυτά τα ακτινωτά πτερύγια των Ακτινοπτερυγίων συνδέονται απευθείας με τα εγγύς ή βασικά σκελετικά στοιχεία, τις ακτίνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το σύνδεσμο μεταξύ αυτών των πτερυγίων και του εσωτερικού σκελετού. Αριθμητικά, τα Ακτινοπτερύγια είναι η κυρίαρχη κλάση των σπονδυλωτών, που περιλαμβάνει σχεδόν το 99% των πάνω από 30.000 ειδών ψαριών (Davis and Brian, 2010). Είναι πανταχού παρόντα σε όλα τα γλυκά και θαλάσσια ύδατα, από τα βάθη της θάλασσας έως τα ρυάκια στις ορεινότερες περιοχές. Στις μέρες μας το μέγεθός τους μπορεί να κυμαίνεται από 8χλ, όπως για παράδειγμα το ψάρι *Paedocypris*, έως την τεράστια ωκεάνια ορθαγορίσκο (sunfish, είδος πέρκας), στα 2.300 κιλά, και το βασιλιά της ρέγγας (oarfish) στα 11μ.

Τα Κυπρινόμορφα (*Cypriniformes*) είναι μια τάξη των ψαριών με ακτινώτα πτερύγια, συμπεριλαμβανομένων των κυπρίνων, γωβιών, loaches και άλλων συγγενών με αυτά ψαριών. Αυτή η τάξη περιέχει 11-12 οικογένειες, πάνω από 400 γένη και πάνω από 4.250 είδη, με νέα είδη να καταγράφονται κάθε λίγους μήνες. Εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία σε περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας, αλλά απουσιάζουν εντελώς σε Αυστραλία και Νότια Αμερική (Nelson, 2006). Όπως και οι άλλες των *Ostariophysi*, τα Κυπρινόμορφα ψάρια διαφέρουν σε σχέση με τους περισσότερους συγγενείς τους, τόσο επειδή έχουν μόνο ένα ραχιαίο πτερύγιο στην πλάτη τους, ενώ τα περισσότερα ψάρια *Ostariophysi* έχουν ένα μικρό σαρκώδη αποτελούμενο από λιπώδη ιστό πτερύγιο πίσω από το ραχιαίο πτερύγιο, όσο και για τη ναπούσια δοντιών στο στόμα τους. Αντ' αυτού, έχουν παραπλήσιες δομές που ονομάζεται φαρυγγικά δόντια στο λαιμό τους. Ενώ άλλες ομάδες ψαριών, όπως οι κιχλίδες, κατέχουν επίσης φαρυγγικά δόντια, τα δόντια των Κυπρινόμορφων αλέθουν με χρήση μιας δομής (chewingpad) στη βάση του κρανίου, αντί με μιας άνω φαρυγγικής σιαγόνας (Nelson, 2006).

Η οικογένεια *Cobitidae* (spined loaches) είναι ένα από τις πιο ευρέως διαδεδομένες οικογένειες των FWF στις ασιατικές και ευρωπαϊκές θάλασσες. Ωστόσο, τα cobitidis σπάνια χρησιμοποιούνται σε γενικές βιογεωγραφικές μελέτες, πιθανόν λόγω της εκτεταμένης ταξινομικής σύγχυσης που επικρατεί όσον αφορά τα ψάρια του γένους *cobitidis*, του συχνού υβριδισμού μεταξύ τους καθώς και της πολυπλοκειδίας που παρουσιάζουν αρκετά από αυτά. Τα ψάρια αυτά είναι εύκολα ανγνωρίσιμα από το επίμηκες σχήμα του σώματός τους και από τον αρσενικό σεξουαλικό διμορφισμό που εμφανίζουν. Πρόωρες ταξινομήσεις των ψαριών αυτών είχαν στηριχθεί σε αυτά τα δευτερεύοντα σεξουαλικά χαρακτηριστικά και στο πρότυπο χρωματισμού του σώματός τους για να καθορίσουν τα ταξινομικά όρια (Gambetta L. 1934, Vladykov V. 1935)

Το γένος *Cobitis* είναι ένα παλαιοαρκτικό γένος ψαριών με ακτινώτα πτερύγια που ανήκει στην οικογένεια *Cobitidae*. Περιέχει τους τυπικούς ακανθώδης μικρού μεγέθους κυπρίνους (spined loaches), συμπεριλαμβανομένων των διαδεδένων αυτών κυπρίνων που ζουν στις εύκρατες περιοχές της δυτικής Ευρασίας. Από τις αρχές του 2012, το γένος περιείχε 69 καταγεγραμμένα είδη. Παρόμοιοι μικρού μεγέθους ακανθώδης κυπρίνοι, που ζουν συνήθως νότια της εμβέλειας των *Cobitis*, διαχωρίζονται στις μέρες μας ως *Sabanejewia*.

Πίνακας 3: Συστηματική κατάταξη των ψαριών που ανήκουν στο γένος *Cobitis*.

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Chordata
Υπόφυλο	Vertebrata
Υπερκλάση	Gnathostomata
Κλάση	Actinopterygii
Τάξη	Cypriniformes
Υπεροικογένεια	Cobitoidea
Οικογένεια	Cobitae
Γένος	Cobitis
Είδος	<i>Cobitis vardarensis</i> / <i>Stephanidisi</i>

2.8 Γεωγραφική Κατανομή

Cobitis vardarensis

Βρίσκεται όπως φαίνεται και στο χάρτη (Εικόνα 4α):

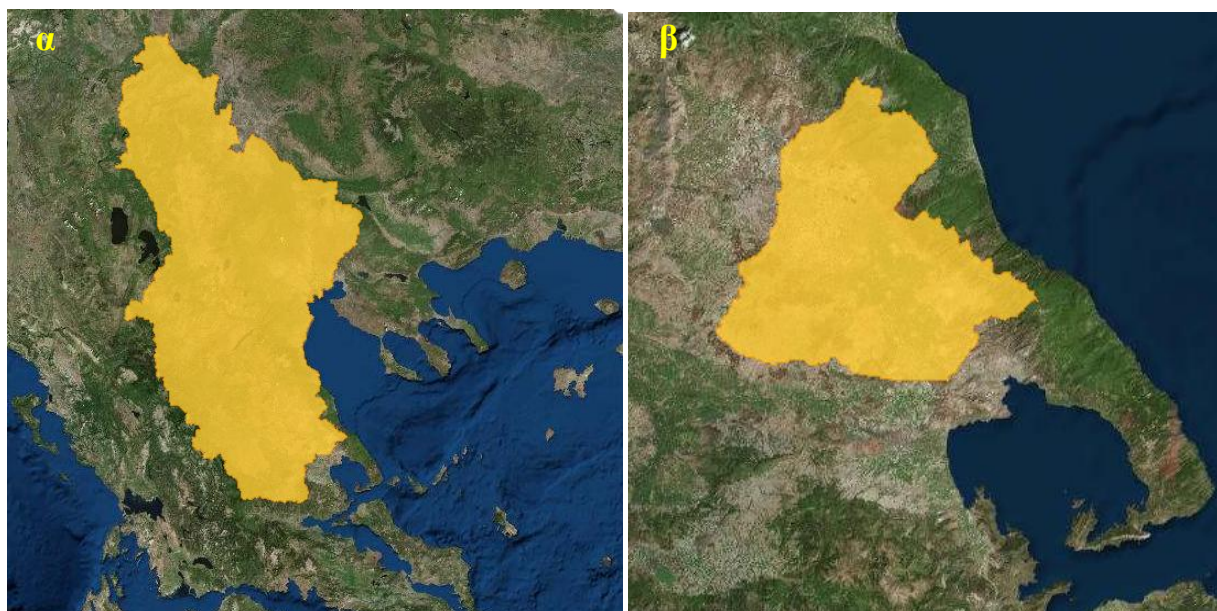
- ✦ Ασία: Τουρκία
- ✦ Ευρώπη: Ελλάδα, Αλβανία, Π.Γ.Δ.Μ και Σερβία

Το *Cobitis vardarensis* έχει καταγράψει ότι βρίσκεται σε κόλπους του Αιγαίου πελάγους, όπου εκβάλλουν ο Πηνειός, ο Αξιός, ο Λουδίας και ο Γαλλικός ποταμός (Freyhof & Kottelat, 2008).

Cobitis stephanidisi

- ✦ Βρίσκεται μόνο στην Ελλάδα

Το *Cobitis stephanidisi* εκριζώθηκε από την πηγή του Κεφαλόβρυσου, στο χωριό Βελεστίνο, όπου βρίσκονταν αρχικά και μετακινήθηκε προς την πρώην λεκάνη της λίμνης Κάρλα, στην κεντρική Ελλάδα (Εικόνα 4β). Σε πρόσφατη έρευνα στις πηγές και τα ρυάκια του Πηνειού και σε προγενέστερες λεκάνες της λίμνης Κάρλα, βρέθηκαν άτομα *Cobitis stephanidisi* στη πηγή Χασαμπάλη (Economidis & Bobori, 2003)



Εικόνα 4.: Γεωγραφική εξάπλωση του α) *Cobitis vardarensis* β) *Cobitis stephanidisi* (<http://maps.iucnredlist.org>).

2.9 Γεωγραφική κατανομή ψαριών του γένους *Cobitis* στον ελλαδικό χώρο

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων έχουν αρχίσει να πραγματοποιούνται μελέτες που στηρίζονται σε μοριακά δεδομένα, με σκοπό να διερευνήσουν τις βιογεωγραφικές συγγένειες ειδών των ψαριών του γένους *Cobitis* που ζουν στον ελλαδικό χώρο. Η πανίδα της Ελλάδας εμφανίζει μεγάλη βιοποικιλότητα, η οποία είναι αποτέλεσμα τεκτονικών, γεωγραφικών και κλιματικών διεργασιών που έλαβαν χώρα κατά το γεωλογικό παρελθόν της περιοχής (Dermitzakis, 1990, Dermitzakis & Papanikolaou, 1981, Meulenkamp, 1985, Sfenthourakis & Legaki, 2001 και Steininger & Rögl, 1984). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) παρουσιάζονται τα είδη του γένους *Cobitis* που έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα.

Πίνακας 4: Γεωγραφική κατανομή ψαριών του γένους *Cobitis* στην Ελλάδα.

Είδος <i>Cobitis</i>	Γεωγραφική Κατανομή
<i>Cobitis vardarensis</i>	Ποταμοί: Πηνειός, Αξιός, Λουδίας, Γαλλικός, Αλιάκμονας Λίμνες: Δοϊράνη, Κάρλα
<i>Cobitis stephanidisi</i>	πηγή Κεφαλόβρυσου Λίμνη Κάρλα
<i>Cobitis strumicae</i>	Λίμνες : Κορώνεια -Βόλβη και Βιστονίδα Ποταμοί: Στρυμόνας – Αγγίτης, Φιλιούρης, Λούρος και Έβρος
<i>Cobitis meridionalis</i>	Λίμνη Πρέσπα
<i>Cobitis (Bicanestrinia)trichonica</i>	Λίμνες: Τριχωνίδα, Λυσιμαχία
<i>Cobitis hellenica</i>	Ποταμός Λούρος
<i>Cobitis arachthosensis</i>	Ποταμός Αραχθός
<i>Cobitis punctilineata</i>	Ποταμοί: Στρυμόνας – Αγγίτης

2.10 Οικολογία και συμπεριφορά

2.10.1 Ενδιαίτημα

Cobitis vardarensis

Το *Cobitis vardarensis*, γνωστό και ως μακεδονική βελονίτσα, βρίσκεται κυρίως σε λίμνες, στάσιμα νερά, σε κόλπους όπου εκβάλλουν ποταμοί, σε βούρκους, και σπάνια σε τρεχούμενα νερά. Ζει τόσο σε γλυκά νερά, όσο και σε θάλασσες και σε ευφάλμυρα υδάτινα περιβάλλοντα. (Kottelat, M. and J. Freyhof, 2007). Το είδος επίσης ζει συνήθως σε ένα βενθοπελαγική εύρος βάθους – πάνω στο βυθό του υδάτινου φορέα και σε υποτροπικό κλίμα.

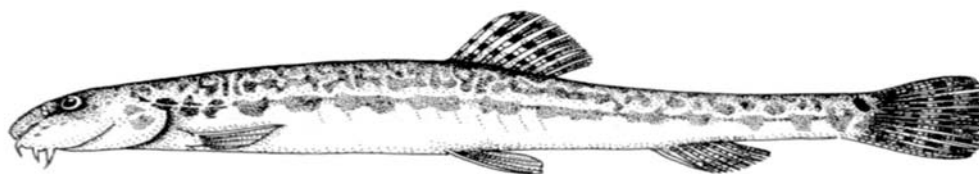
Cobitis stephanidisi

Το φυσικό του περιβάλλον είναι πηγές γλυκού νερού. Το *Cobitis stephanidis*, γνωστό κοινώς ως Φεροβελονίτσα (Velestino spined loach) (Barbieri et al, 2015) είναι ένα βραχύβιο είδος. Τα ενήλικα άτομα ζουν σε χειμάρρους πεδινών περιοχών με ήπια ρεύματα και σε υδάτινες πηγές που συνεδέονται με βαλτώδης υγρότοπους, με υποβρύχια βλάστηση (Economidis and Nalbant, 1996).

2.10.2 Φυσική περιγραφή

Το σώμα των ψαριών της οικογένειας *Cobitidae* τείνει να είναι σκωληκοειδής, καθώς είναι χαρακτηριστικά πολύ επιμηκυμένο και συνήθως κυλινδρικό ή ελαφρά πιεσμένο στα πλάγια. (Εικόνα 5). Τα περισσότερα δεν έχουν πραγματικά λέπια, αλλά όπου υπάρχουν είναι πολύ μικρά και σφηνωμένα μέσα στο δέρμα. Τα μάτια είναι μικρά και συνήθως βρίσκονται στη ράχη, ενώ το μικρό τους στόμα βρίσκεται στο κάτω μέρος του κεφαλιού, κατάλληλο για σάρωση του βυθού και εύρεση έτσι της τροφής τους, έχει σαρκώδη χείλη, και όπως σε πολλά άλλα κυπρινόμορφα (*Cypriniformes*) ή γατόψαρα, περιβάλλεται από 6 έως 12 αισθητήρια μουστάκια (συνήθως τρία έως έξι ζευγάρια). Τα *Cobitidae* είναι συγγενικά με τα *Cyprinidae*, και έχουν φαρυγγικά δόντια για τον τεμαχισμό της τροφής. Υπάρχει μόνο ένα ραχιαίο πτερύγιο και τα υπόλοιπα πτερύγια είναι μέτρια αναπτυγμένα.

Το *Cobitis stephanidisi* είναι ένα είδος ψαριού με ακτινωτά πτερύγια (ray-finned) που ανήκει στην οικογένεια *Cobitidae* και το μέγιστο μήκος του σώματός που μπορεί να φτάσει είναι περίπου 11 εκ. για το αρσενικό και 9 εκ. για το θηλυκό (Kottelat & Freyhof, 2007).



Εικόνα 5: *Cobitis*

2.10.3 Ηθολογικά χαρακτηριστικά

Τα ψάρια της οικογένειας *Cobitidae* είναι ως επί το πλείστον ζώα που τρέφονται με ακαθαρσίες, είναι παμφάγα και συνήθως δεν είναι πολύ επιλεκτικά στο φαγητό τους, αλλά είναι προσαρμοσμένα στην κατανάλωση άλγης και ποικίλων μικροσκοπικών ζώων. Μπορούν να τρώνε υδρόβια οστρακόδερμα, έντομα και άλλα μικρά βενθικά ασπόνδυλα, καθώς και υπολείμματα οργανικών καταλοίπων. Πολλά ζουν σε ευτροφικά νερά γενικώς κακής ποιότητας και τρέφονται με σκουλήκια *tubifex* και παρόμοιους βενθικούς οργανισμούς που συνδέονται με τον εν λόγω οικοτόπο. Τα περισσότερα είδη είναι νυκτόβια, παραμένοντας κρυμμένα την ημέρα κάτω από πέτρες, ανάμεσα στα φύκια ή θαμμένα κάτω από την άμμο ή από χαλίγια. Μερικά από αυτά έχουν προσαρμοστεί σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου σε ζεστά, λασπώδη ποτάμια ή σε βρώμικες λίμνες με το να είναι σε θέση να καταπίνουν το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Ορισμένα είδη, ιδιαίτερα από το γένος *Cobitis* και ειδικά τα *Misgurnus*, είναι ευαίσθητα στην αλλαγή της πίεσης του αέρα. Μπορούν να αλλάξουν τη συμπεριφορά τους ανάλογα, και καθώς αυτές οι αλλαγές στη δραστηριότητά τους συνήθως ακολουθούνται από μια αλλαγή του καιρού, είναι κοινώς γνωστά ως "ψάρια του καιρού".

Μερικά *Cobitidae* έχουν εισαχθεί σε ξένα ενδιαιτήματα, όπου μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στην τοπική άγρια ζωή, ως χωροκατακτητικά είδη. Άλλα *loaches*, όπου πολλά από αυτά είναι μεταναστευτικά ψάρια, έχουν πληγεί σοβαρά από την καταστροφή των οικοτόπων, τη χημική ρύπανση, και τη κατασκευή φραγμάτων, και θεωρούνται στις μέρες μας απειλούμενα είδη. Ορισμένα μεταναστευτικά είδη είναι δημοφιλή ψάρια ενυδρείου και δεδομένου ότι είναι πολύ δύσκολο να ανατραφούν σε αιχμαλωσία, η υπεραλίευση έχει εξαντλήσει σοβαρά το πληθυσμό τους σε αρκετές περιπτώσεις.

2.11 Απειλές

Τα *Cobitis vardarensi* και *Cobitis stephanidisi* απειλούνται από την υπερβολική υδροληψία, τη ξηρασία και τη ρύπανση που προκαλούν καταστροφή των ενδιαιτημάτων όπου ζουν.

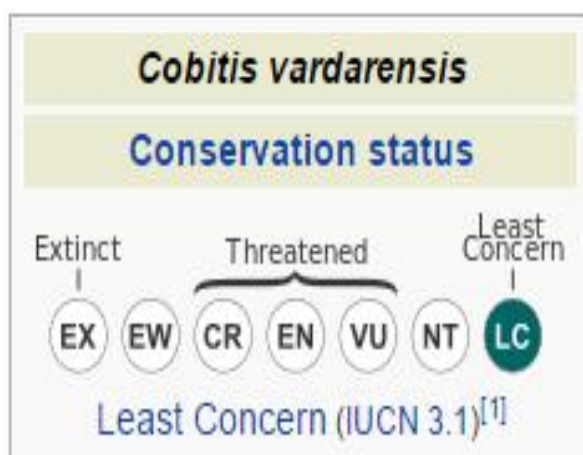
2.12 Πληθυσμός

Cobitis vardarensis

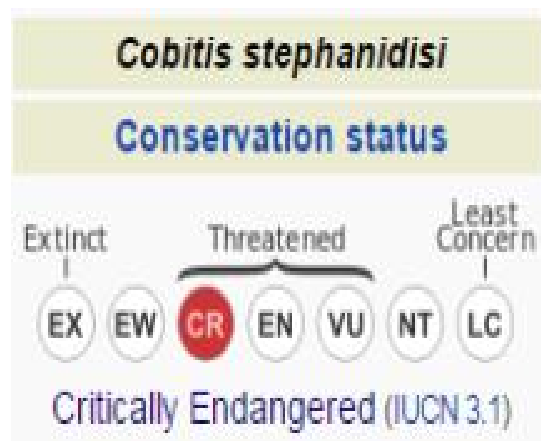
Ο πληθυσμός του είδους αυτού είναι γνωστό ότι βρίσκεται σε μεγάλη άφθονια και δεν απειλείται με εξαφάνιση (έχει καταγραφεί ως ελάχιστα απειλούμενο για να γίνει είδος υπό εξαφάνιση) (Εικόνα 6α). Ένας οργανισμός είναι μη απειλούμενος με εξαφάνιση όταν έχει αξιολογηθεί με βάση τα κριτήρια και δεν πληρεί τις προϋποθέσεις ώστε να χαρακτηριστεί ως κρισίμα απειλούμενος υπό εξαφάνιση, απειλούμενος υπό εξαφάνιση, ευάλωτος ή σχεδόν απειλούμενος. Διαδεδομένοι και σε άφθονα οργανισμοί περιλαμβάνονται σε αυτή την κατηγορία. Η τάση διακύμανσης του πληθυσμού στο μέλλον είναι άγνωστη.

Cobitis stephanidisi

Ο πληθυσμός του είδους αυτού έχει χαρακτηριστεί ως κρισίμα απειλούμενος υπό εξαφάνιση (Εικόνα 6β). Το είδος αυτό αξιολογείται ως κρίσιμα απειλούμενο καθώς ζει σε μία πολύ περιορισμένη σε εύρος περιοχή, περιορίζεται σε μία μόνο πηγή (έκταση όπου εμφανίζεται <100χλμ.², και την περιοχή όπου καταλαμβάνει <10χλμ.²). Επιπλέον έχει εκριζωθεί από την αρχικό τόπο διαμονής του την καρστική πηγή του Κεφαλόβρυσου ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση της ποιότητας των ενδιαιτημάτων και της διαθεσιμότητας τους λόγω της γεωργικής ρύπανσης και της άντλησης νερού (Crivelli, 2005).



Εικόνα 6.α



Εικόνα 6.β

Εικόνα 6 α,β: Απεικόνιση του βαθμού που απειλείται με εξαφάνιση το α) *Cobitis vardarensis* β) *Cobitis stephanidisi* (<http://www.iucnredlist.org>)

2.13 Σκοπός

Τα είδη του γένους *Cobitis* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και γενετική ποικιλότητα επειδή δεν διαφέρουν μόνο σε επίπεδο είδους, αλλά και ενδοειδικά. Η συστηματική όμως ταξινόμηση αυτών, όσον αφορά τη λίμνη Κάρλα, είναι ανεπαρκής. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συμβολή στην κάλυψη αυτού του κενού, με τη γενετική ανάλυση 12 δειγμάτων ιχθύων του γένους *Cobitis* από τη λίμνη Κάρλα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με PCR-SSCP ενός τμήματος του γονιδίου κυτοχρώματος β (*cytb*).

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Δειγματοληψία - Βιολογικό Υλικό

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στην ανάλυση 12 δειγμάτων-ιχθύων του γένους *Cobitis*, της οικογένειας *Cobitidae* (loaches - Μακεδονική βελονίτσα, είδος μικρού κυπρίνου) που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια δύο περιόδων, 5 δείγματα το Μάρτιο και 7 δείγματα τον Ιούνιο του 2015, από τη λίμνη Κάρλα στα όρια των Νομών Λαρίσης και Μαγνησίας. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο που περιείχε 70% αλκοόλη και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με σκοπό την ταυτοποίηση του είδους.

3.2 Επεξεργασία δειγμάτων

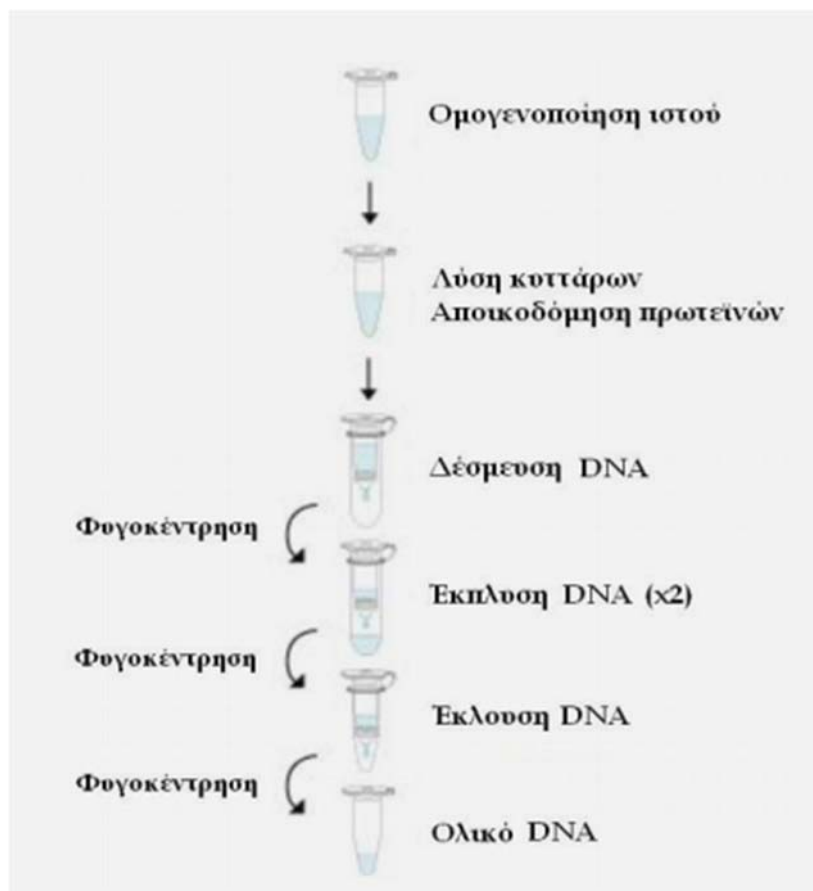
Από κάθε δείγμα ξεχωριστά αφαιρέθηκαν 50 mg μυϊκού ιστού προκειμένου να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA.

3.3 Εξαγωγή γενετικού υλικού

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από 50mg δείγματος χρησιμοποιήθηκε το Pure Link Quick PCR Purification Kit (Invitrogen), ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Αναλυτικά η διαδικασία της απομόνωσης (Εικόνα 7) αυτής περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- ✚ Αρχικά τεμαχίζουμε το δείγμα και τοποθετούμε τον ιστό σε σωληνάρια eppendorf των 2 ml.
- ✚ Στη συνέχεια προσθέτουμε 180μl Genomic Digestion buffer και 20 μl πρωτεϊνάσης K και αναδεύουμε.
- ✚ Επωάζουμε τα δείγματα στους 55°C για περίπου 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση.
- ✚ Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο eppendorf των 2ml.
- ✚ Έπειτα προσθέτουμε 20μl RNase, αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- ✚ Προσθέτουμε 200μl Genomic lysis/binding buffer και αναδεύουμε στο vortex.
- ✚ Ακόμα προσθέτουμε 200μl αιθανόλη 100% και αναδεύουμε έντονα στο vortex.
- ✚ Μεταφέρουμε το διάλυμα στις ειδικές στήλες του Kit με το σωληνάριο συλλογής.

- + Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 1 λεπτό.
- + Προσθέτουμε 450μl Wash buffer 1 και επαναλαμβάνουμε το βήμα 9.
- + Μεταφέρουμε τη στήλη σε νέο σωληνάριο συλλογής, προσθέτουμε 450μl Washbuffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 3 λεπτά.
- + Τοποθετούμε τη στήλη σε erpendorf του 1.5ml, προσθέτουμε 100μl Elution buffer και επωάζουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- + Τέλος φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 13000 στροφές
- + Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA είτε στους 4°C για άμεση χρήση είτε στους -20°C για μελλοντική.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των βασικών βημάτων απομόνωσης ολικού DNA.

3.4 Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του DNA

Για να χρησιμοποιηθεί το προϊόν της εξαγωγής (γενωμικό DNA) ως μήτρα (template) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του ενζυμικού πολλαπλασιασμού (PCR) ακολούθησε η ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του DNA μετά από ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Πίνακας 5).

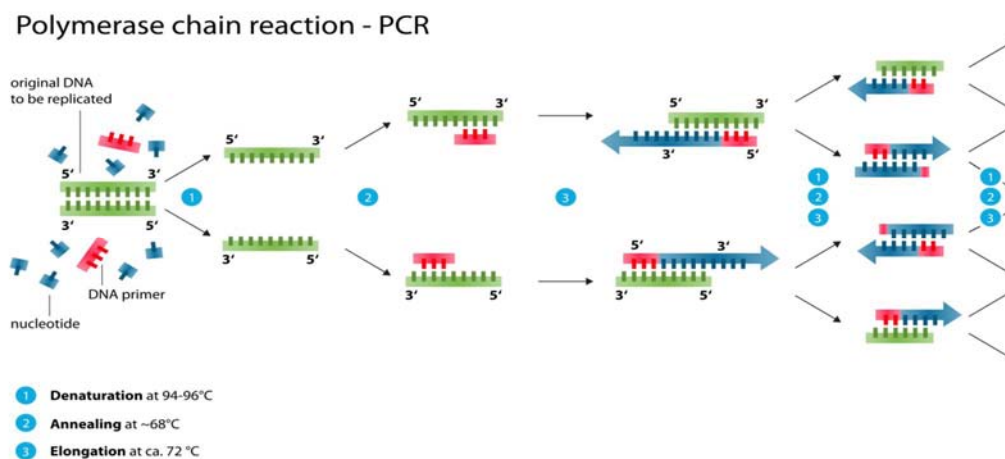
Πίνακας 5: Συστατικά πηκτώματος αγαρόζης

Παρασκευή πήκτης αγαρόζης	
TAE 1x	50 ml
Αγαρόζη	0.8 gr
Βρωμιούχοαιθίδιο (10mg/ml)	5 μl

3.5. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου κυτοχρώματος β (*cytb*)

Η PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985. Σήμερα αντιμετωπίζεται σαν μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA. Ο εφευρέτης της μεθόδου Kary Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993.

Η PCR είναι μια πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο γιατί για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (en.wikipedia.org).

Χρησιμοποιήθηκαν παγκόσμιοι εκκινητές έτσι ώστε να ενισχυθεί ένα τμήμα μεγέθους 376bp, του μιτοχondριακού γονιδίου, κυτοχρώματος β (*cytb*) (Palumbietal, 1991). Στον πίνακα 6 που ακολουθεί, φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR.

Πίνακας 6: Εκκινητές της αντίδρασης PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία
L14841	5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'
H15149	5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων PCR περιγράφεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Συστατικά αντίδρασης PCR.

Εκμαγείο DNA (50 ng/μl)	2μl
Buffer TAE 10x	5μl
MgCl ₂ (50mM)	2μl
dNTPs (10mM each)	1μl
Primer forward (50 pmoles/μl)	1μl
Primer reverse (50 pmoles/μl)	1μl
TaqDNA polymerase (5units/μl)	0,2μl
ddH ₂ O	37,8 μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Η PCR εφαρμόζεται με την βοήθεια ενός θερμοκυκλοποιητή, η αντίδραση ξεκινάει με αρχική θερμοκρασία 95°C για 4 λεπτά έτσι ώστε το δίκλωνο DNA να αποδιαταχθεί. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 35 κύκλοι θερμοκρασιών, όπου η θερμοκρασία μεταβάλλεται ως εξής: αρχικά φτάνει στους 95°C για 40 δευτερόλεπτα όπου αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA, στη συνέχεια πέφτει στους 52°C για 40 δευτερόλεπτα όπου υβριδοποιείται ο κάθε κλώνος με το σύμπλοκο του εκκινητή και τέλος ανεβαίνει στους 72 °C για άλλα 40 δευτερόλεπτα όπου προσδένεται η Taq DNA πολυμεράση και τα πρώτα συμπληρωματικά dNTPs και αρχίζει έτσι η επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου κλώνου DNA .

Πίνακας 8: Συνθήκες αντίδρασης PCR για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του κυτοχρώματος β (cytb).

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4 min
Αποδιάταξη	95°C	40 sec
Υβριδοποίηση	52°C	1 min
Επιμήκυνση	72 °C	1 min
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min
Αριθμός κύκλων	35	

Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτη αγαρόζης 2% (w/v).

3.6 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP είναι από τις πιο απλές και πιο χρήσιμες μεθόδους για την ανίχνευση μεταλλαγών και τυχόν πολυμορφισμών.

Κατά την ανάλυση αυτή, τα DNA τμήματα διαχωρίζονται ως μονόκλωνα μόρια σε μη αποδιατακτική πήκτη πολυακρυλαμίδης. Καθώς μία αλυσίδα μονόκλωνου DNA αναδιπλώνεται διαφορετικά από μία άλλη αλυσίδα, αν αυτές διαφέρουν ως προς μία βάση, έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικό κινητικό πρότυπο. Αυτές οι παραλλαγές εμφανίζονται ως διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο.

Η ανάλυση SSCP μας δείχνει διαφορές στο ηλεκτροφορετικό πρότυπο και όχι την ακριβή παραλλαγή· για αυτό το λόγο μετά την ανάλυση ακολουθείται αλληλούχηση του συγκεκριμένου προϊόντος PCR.

Συγκεκριμένα, στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 7μl PCR προϊόντος, στα οποία έγινε προσθήκη 10μl αποδιατακτικού διαλύματος φορμαμίδιου (denaturation buffer), που αποδιατάσσει τα δίκλωνα μόρια του PCR προϊόντος. Στη συνέχεια με παραμονή για 8 λεπτά στους 96°C πραγματοποιήθηκε πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν αμέσως σε πάγο προκειμένου να μην υβριδοποιηθούν τα μονόκλωνα μόρια DNA.

Ακολούθως τα δείγματα φορτώθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% όπου και ηλεκτροφορήθηκαν στα 220V για 20 ώρες περίπου, σε θερμοκρασία 4°C.

Για την παρασκευή πήκτης ακρυλαμίδης 12% αναμείχθηκαν: 7.5gr ακρυλαμίδης, 0.25gr bis-ακρυλαμίδης, 3.15ml buffer TBE 10x , και 6 ml γλυκερόλης 50% τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε ποτήρι ζέσεως και αναδεύτηκαν με τη χρήση μαγνήτη. Έπειτα πραγματοποιήθηκε διήθηση του διαλύματος με σταδιακή προσθήκη αποσταγμένου νερού έως ότου το διάλυμα να φτάσει τα 65ml. Το διάλυμα, στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη, προστέθηκαν 65ml TEMED και 400μl APS 20%, και έπειτα από καλή αναδύση το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Μετά από 20 ώρες ακολούθησε η χρώση της πήκτης με νιτρικό άργυρο.

Η διαδικασία χρώσης έχει ως εξής:

- Αφαίρεση της πήκτης προσεκτικά από το καλούπι και τοποθέτησή της πάνω σε μία πλαστική-διάφανη μεμβράνη, μέσα σε ένα μεταλλικό πιάτο υπό ανάδευση. Παρασκευή του πρώτου διαλύματος: 400ml H₂O + 1ml οξικού οξέος.
- Ξέπλυμα της πήκτης δύο φορές με το διάλυμα οξικού οξέος (200ml κάθε φορά) με παράλληλη ανάδυσή της για 3 λεπτά. Αφαίρεση του διαλύματος και ξέπλυμα με δις-αποσταγμένο νερό (ddH₂O).
- Παρασκευή δευτέρου διαλύματος: 1g νιτρικού αργύρου σε 1 λίτρο νερό.
- Προσθήκη 200 ml από το δεύτερο διάλυμα στη πήκτη, και πραμονή της με το διάλυμα για 10 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Μετά ξέπλυμα με δις-αποσταγμένο νερό (ddH₂O) δύο φορές.
- Παρασκευή του τρίτου διαλύματος. Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως: 3g καυστικού νατρίου (NaOH), 1ml φορμαλδεϋδης (HCHO) και 0.01g βοροϋδρίδιου του νατρίου (NaBH₄). Στη συνέχεια προστίθεται το τρίτο διάλυμα στη πηκτή και παραμένει μέσα σε αυτό υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν όλες οι ζωνώσεις καθαρά.
- Τέλος καλό ξέπλυμα της πηκτής ακρυλαμίδης με δις-αποσταγμένο νερό (ddH₂O) και αποθήκευσή της.

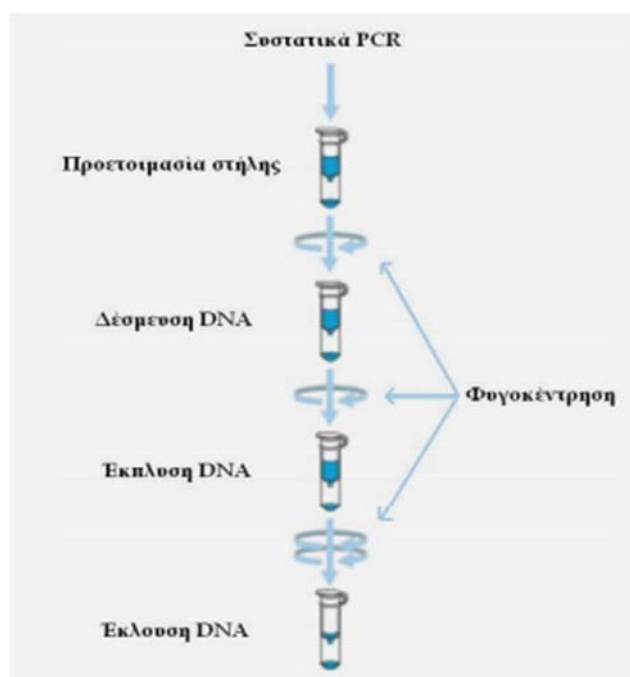
Έπειτα μετά και τη χρώση της πηκτής ακρυλαμίδης, επιλέχθηκαν από αυτή 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο για να σταλούν για αλληλούχηση, αφού πρώτα καθαρίστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου kit, NucleoSpin Gel&PCR clean-up, Macherey-Nagel. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CeMia, στη Λάρισα.

3.7 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Όπως αναφέρθηκε πριν, η SSCP ανάλυση υποδεικνύει ότι διαφέρουν οι αλληλουχίες μεταξύ τους αλλά δεν γνωρίζουμε σε πόσες και ποιες θέσεις. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η αλληλούχηση των PCR προϊόντων. Για να σταλούν όμως τα PCR προϊόντα για αλληλούχηση θα πρέπει πρώτα να καθαριστούν. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιείται με σκοπό να απομακρυνθούν όλες οι προσμίξεις που αλλοιώνουν το DNA, ώστε να μπορέσει η αλληλουχία να αναλυθεί όσο το δυνατό πιο αποτελεσματικά. Τέτοιες προσμίξεις αποτελούν κατάλοιπα ουσιών που είτε χρησιμοποιήθηκαν στην PCR, είτε απέμειναν από την απομόνωση του DNA, όπως για παράδειγμα άλατα, ένζυμα, απορρυπαντικά, καθώς και ολιγονουκλεοτίδια. Κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής, ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit Nucleospin® Gel&PCR clean-up της εταιρίας Macherey–Nagel, βάσει του πρωτοκόλλου της εταιρίας. Η έκλυση του DNA (Εικόνα 9) έγινε σε τελικό όγκο 20μl, το οποίο και διατηρήθηκε στη συνέχεια στους -20°C, για να σταλεί για αλληλούχηση σε εξωτερικό εργαστήριο.

Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR Μέθοδος Nucleospin® Extract II, από το kit καθαρισμού προϊόντων PCR της εταιρίας Macherey – Nagel (με τροποποιήσεις). Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

1. Ανάμιξη σε καθαρό σωλήνα erppendorf του συνολικού προϊόντος της PCR με διπλάσιο όγκο διαλύματος NT.
2. Μεταφορά του διαλύματος σε ειδική στήλη (παρέχεται από την εταιρία).
3. Φυγοκέντρηση για 1 min σε 11.000 x g και απομάκρυνση του υποκειμένου.
4. Προσθήκη στη στήλη 600 μl διαλύματος NT3.
5. Επανάληψη του βήματος 3.
6. Φυγοκέντρηση για 2 min σε 11.000 x g και απομάκρυνση του υποκειμένου.
7. Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωλήνα erppendorf και προσθήκη 15 μl διαλύματος έκλυσης BE (elution buffer).
8. Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 90 sec σε 10.000 x g.
9. Φύλαξη του υποκειμένου στους -20 oC.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας καθαρισμού των προϊόντων της PCR. Η μέθοδος στηρίζεται στην πρόσδεση του DNA σε ειδική μεμβράνη (silica membrane), παρουσία χαοτροπικών αλάτων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ηλεκτροφόρηση DNA

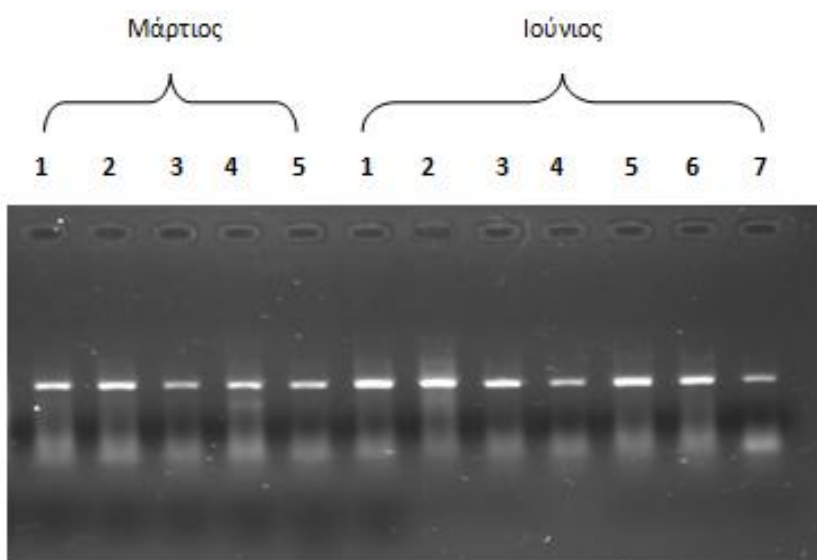
Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης του απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA των 12 δειγμάτων του γένους *Cobitis*.

4.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

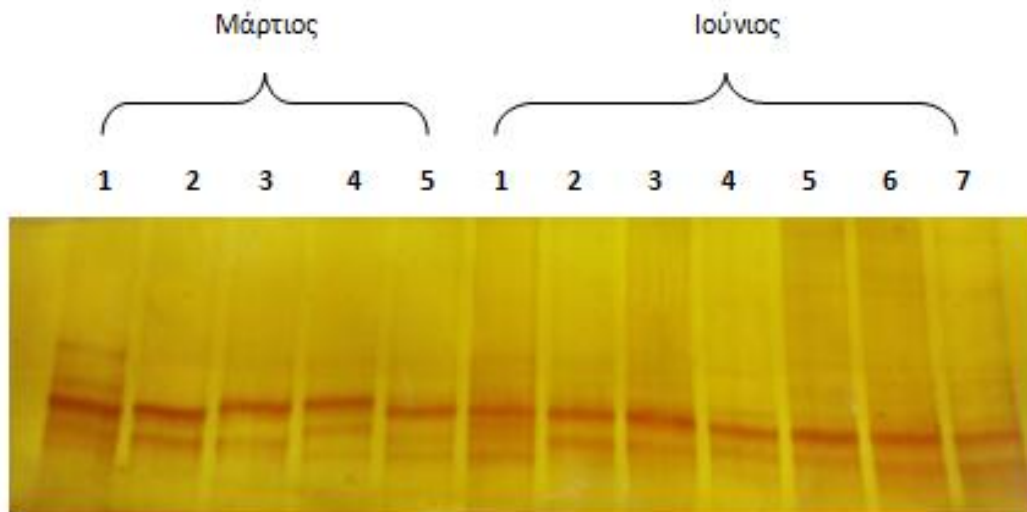
Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτη αγαρόζης 2% (w/v) με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της αντίδρασης PCR.

4.3 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας, SSCP

Τα προϊόντα PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης 10%, για 20 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνώσεων μενιτρικό άργυρο αποκάλυψε 4 διαφορετικά πρότυπα για το *cytb* (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Πρότυπα ανάλυσης SSCP.

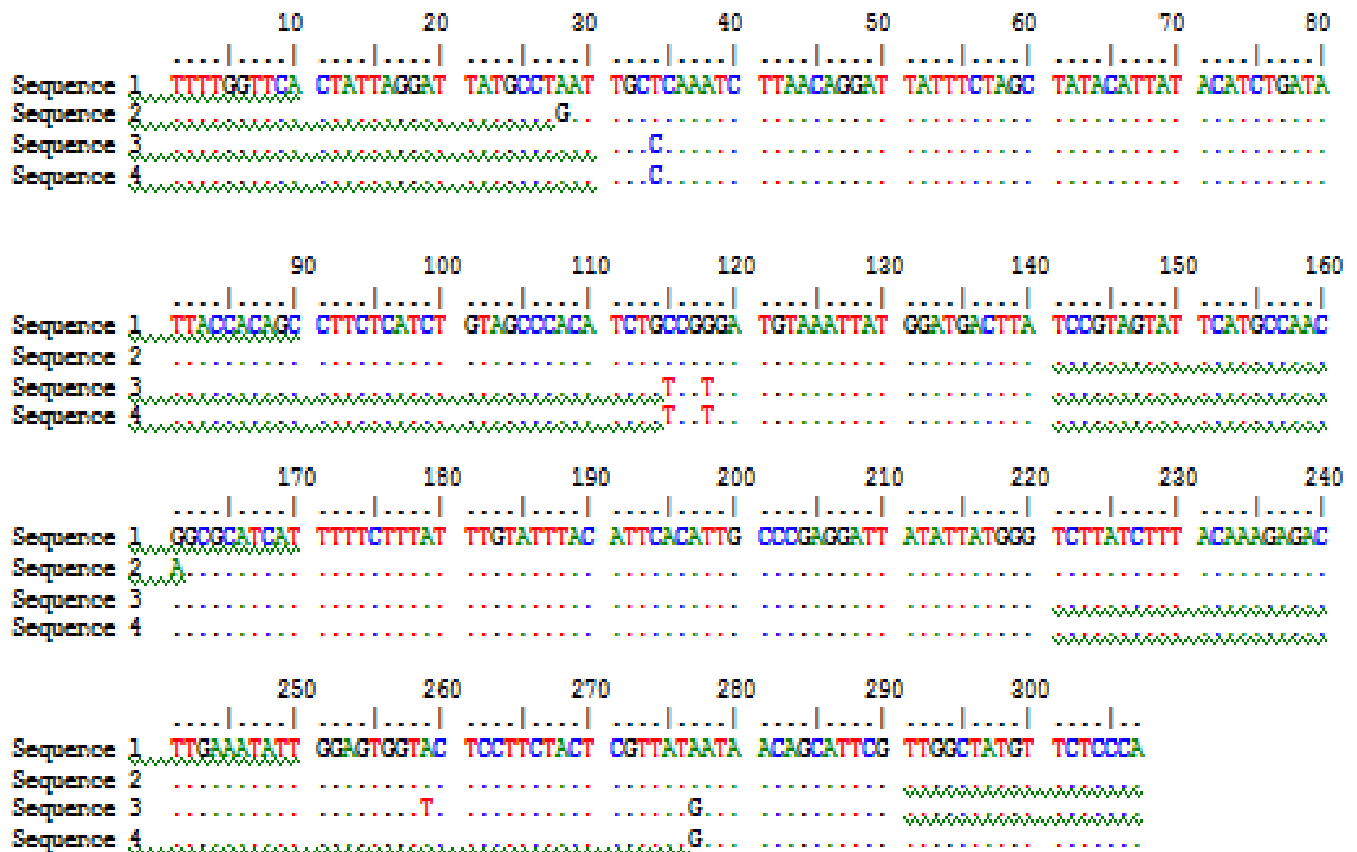
4.4 Αλληλούχηση

Για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία για τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο εκκινητές.. Τα δυο χρωματογραφήματα πουλήφθηκαν για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα ClustalX. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν, για κάθε δείγμα, από τα διαφορετικάπρότυπα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9:

Πίνακας 9: Οι αλληλουχίες (κωδικοποιημένες) που προέκυψαν για κάθε δείγμα.

Δείγματα	Αλληλουχία
Μάρτιος S1	Sequence 1
Μάρτιος S2	Sequence 4
Μάρτιος S3	Sequence 3
Μάρτιος S4	Sequence 2
Μάρτιος S5	Sequence 4
Ιούνιος S1	Sequence 4
Ιούνιος S2	Sequence 4
Ιούνιος S3	Sequence 4
Ιούνιος S4	Sequence 4
Ιούνιος S5	Sequence 4
Ιούνιος S6	Sequence 4
Ιούνιος S7	Sequence 4

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν για το κυτόχρωμα β φαίνονται στην Εικόνα 13:



Εικόνα 13: Αποτελέσματα αλληλούχησης του τμήματος του κυτοχρώματος b.

4.5 Ταυτοποίηση ειδών

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στη παγκόσμια βάση δεδομένων National Center for Biotechnology Information (NCBI), χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης καθώς και το ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα σύγκρισης αλληλουχιών.

Αλληλουχία	Είδος	Ομολογία
Sequence 1	<i>Cobitis vardarensis</i>	99% (306/307bp)
Sequence 2	<i>Cobitis vardarensis</i>	99% (304/307bp)
Sequence 3	<i>Cobitis stephanidisi</i>	99% (306/307bp)
Sequence 4	<i>Cobitis stephanidisi</i>	100% (307/307bp)

Η ταυτοποίηση των ειδών σε κάθε δείγμα, παρουσιάζεται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Ταυτοποίηση δειγμάτων σε επίπεδο είδους και ποσοστό ομολογίας με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες.

Δείγματα	Αλληλουχία
Μάρτιος S1	<i>Cobitis vardarensis</i> 99%
Μάρτιος S2	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%
Μάρτιος S3	<i>Cobitis stephanidisi</i> 99%
Μάρτιος S4	<i>Cobitis vardarensis</i> 99%
Μάρτιος S5	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%
Ιούνιος S1	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%
Ιούνιος S2	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%
Ιούνιος S3	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%
Ιούνιος S4	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%
Ιούνιος S5	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%
Ιούνιος S6	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%
Ιούνιος S7	<i>Cobitis stephanidisi</i> 100%

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λίμνη Κάρλα, που βρίσκεται στα όρια των Νομών Λαρίσης και Μαγνησίας, πριν την αποξήρανσή της, στα τέλη του 1962, αποτελούσε ένα ιδιαίτερα σημαντικό υδροβιότοπο όχι μόνο για την Ελλάδα, αλλά και για τα Βαλκάνια. Έτσι στις μέρες πραγματοποιείται προσπάθεια αποκατάστασής της, ενώ παράλληλα διεξάγονται διάφορες μελέτες που στοχεύουν στη γενετική ανάλυση της ιχθυοπανίδας της. Τα είδη του γένους *Cobitis* αποτελούν μία από τις πιο ευρέως κατανεμημένες Παλαιαρκτικές ομάδες πρωτογενών ψαριών του γλυκού νερού (Banarescu, 1990). Η συστηματική όμως ταξινόμησή τους στην λεκάνη απορροής της λίμνης Κάρλα είναι ανεπαρκής. Στην παρούσα, λοιπόν εργασία πραγματοποιήθηκε γενική ταυτοποίηση 12 δειγμάτων ψαριών του γένους *Cobitis*, που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια δύο περιόδων (Μάρτιος και Ιούνιος, 2015) από τη λίμνη Κάρλα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης των ψαριών του γένους *Cobitis*, 10 από τα 12 ψάρια των δειγματοληψιών αυτών, ταυτοποιήθηκαν ως *Cobitis stephanidisi* και 2 ταυτοποιήθηκαν ως *Cobitis vardarensis*.

Όσον αφορά το *Cobitis stephanidisi*, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την μετακίνηση του, που παρατηρήθηκε τα τελευταία χρόνια, από την πηγή του Κεφαλόβρυσου Βελεστίνου, όπου βρίσκονταν αποκλειστικά αρχικά, προς την λεκάνη τη λίμνης Κάρλα. Η μετακίνηση αυτού του είδους πραγματοποιήθηκε πιθανόν μέσω καναλιών και χειμάρρων όπου πηγάζουν από τη πηγή του Κεφαλόβρυσου και εκβάλλουν στη λίμνη Κάρλα.

Όσον αφορά τον ενδοειδικό πολυμορφισμό των δύο ειδών που ταυτοποιήθηκαν, από τα αποτελέσματα τις αλληλούχησης παρατηρούμε ότι τα *Cobitis vardarensis* εμφανίζονται με δύο αλληλουχίες (εξετάστηκαν 2 άτομα), 1 και 2, οι οποίες διέφεραν μεταξύ τους σε 2 θέσεις (28 και 161, Εικόνα 13). Ομοίως και τα *Cobitis stephanidisi* εμφανίζονται με δύο αλληλουχίες, 3 και 4, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους στη θέση 259 (Εικόνα 13). Ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιδιαίτερα μικρός. Μελετήθηκαν δείγματα από 12 μόνο άτομα, εκ των οποίων τα 10 ανήκουν στο ίδιο είδος. Επακόλουθο αποτέλεσμα αυτού, είναι η αδυναμία εξαγωγής αξιόπιστων συμπερασμάτων για την πολυμορφικότητα του γονιδίου του κυτοχρώματος β στα ψάρια του γένους *Cobitis*.

Συνοψίζοντας λοιπόν, το γονίδιο του κυτοχρώματος β (*cytb*) παρουσιάζει αυξημένη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ψαριών του γένους *Cobitis* τόσο διαειδικά όσο και ενδοειδικά μέσα στην ίδια γεωγραφική περιοχή.

Τέλος, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή επιπλέον μελετών ώστε να αποκτήσουμε εμπειριστατωμένη άποψη σχετικά με τα είδη του γένους *Cobitis* που έχουν ως ενδιαίτημα τη λίμνη Κάρλα, καθώς και της γενετικής ποικιλομορφίας που εμφανίζουν. Οι μελέτες αυτές πρέπει να περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ώστε να μπορούμε να οδηγηθούμε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα τόσο για τα είδη του γένους *Cobitis* της λίμνης Κάρλα όσο και για το μέγεθος των πληθυσμών τους. Επιπρόσθετα, η γενετική ανάλυση πυρηνικών γονιδίων μπορεί να δώσει πληροφορίες για πιθανούς υβριδισμούς μεταξύ των ειδών *Cobitis stephanidisi* και *Cobitis vardarensis*.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✦ Barbieri R., S. Zogaris, E. Kalogianni, M. Th. Stoumboudi, Y. Chatzinikolaou, S. Giakoumi, Y. Kapakos, D. Kommatas, N. Koutsikos, V. Tachos, L. Vardakas & Economou A.N., 2015. Freshwater Fishes and Lampreys of Greece e: An annotated checklist. Monographs on Marine Sciences No. 8. Hellenic Centre for Marine, p. 130. ISBN: 978-960-9798-06-8
- ✦ Bibb MJ., Vanetten RA., Wright CT., Walberg MW., Clayton DA. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*. 26:167-180.
- ✦ Bininda-Emonds O.R.P. (2000). Factors influencing phylogenetic inference: a case study using the mammalian carnivores. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16(1): 113-126.
- ✦ Blair J.E., Hedges S.B. (2005). Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol Biol Evol*. 22(11): 2275-84.
- ✦ Bourlat S.J., Nielsen C., Economou A.D., Telford M.J. (2008). Testing the new animal phylogeny: a phylum level molecular analysis of the animal kingdom. *Mol Phylogenet Evol*. 49(1): 23-31.
- ✦ Brown WM., George M., Wilson A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76: 1967- 1971
- ✦ Chenuil A. (2006). Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127: 101-120.
- ✦ Clayton D.A. 1992. Structure and function of the mitochondrial genome. *JIMD* 15:439-447.
- ✦ Conway S. (2003). *Life's Solution. Inevitable Humans in a Lonely Universe*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- ✦ Cooper MD, Alder MN (February 2006). «The evolution of adaptive immune systems». *Cell* **124** (4): 815–22.
- ✦ Crivelli, A.J.. *Cobitis stephanidisi*. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. 2005
- ✦ Dermitzakis D.M. (1990). Paleogeography, geodynamic processes and event stratigraphy during the Late Cenozoic of the Aegean area. *Accademia Nazionale de. Lincei* 85: 263–288
- ✦ Dermitzakis D.M., Papanikolaou D.J. (1981). Paleogeography and geodynamics of the Aegean region during the Neogene. *Annales Geologiques de Pays Hellenique* 30: 245–289.
- ✦ Dobzhansky, Th. 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York

- ✦ Doadrio I, Carmona JA. Testing freshwater Lago mare dispersal theory on the phylogeny relationships of Iberian cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Graellsia* 2003; 59 (2–3): 457–473.
- ✦ Doadrio I, Carmona JA. Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Chondrostoma* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2004; 33: 802–815. PMID:15522805
- ✦ Durand JD, Ünlü E, Doadrio I, Pipoyan S, Templeton AR. Origin, radiation, dispersion and allopatric hybridization in the chub, *Leuciscus cephalus*. *Proc R Soc London B.* 2000; 267: 1687–1697.
- ✦ Economidis, P.S. and Teodor T. Nalbant, 1996. A study of the loaches of the genera *Cobitis* and *Sabanejewia* (Pisces, Cobitidae) of Greece, with description of six new taxa. *Trav. Mus Natl. Hist. Nat. 'Grigore Antipa'* 36:295-347.
- ✦ Futuyma, D.J. 1995. *Science on Trial: the Case for Evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. ISBN 0-87893-184-8
- ✦ Gambetta L. Sulla variabilità del Cobite fluviale (*Cobitis taenia*, L.) e sul rapporto numerico dei sessi. *Boll Mus Zool Anat Comp R Univ Torino.* 1934; 44: 297–324.
- ✦ Gouliaeva N.A., Kuznetsova E.A., Gaziev A.I. (2006). Proteins associated with mitochondrial DNA protect it against X-rays and hydrogen peroxide. *Biophysics* 51(4): 620–623
- ✦ Hillis DM., Moritz C. 1990. *Molecular Systematics*, Sunderland Sinauer Assoc. Inc.
- ✦ Hillis D.M., Wiens J.J. (2000). Molecular versus morphological systematics: Conflicts, artifacts, and misconceptions. In Wiens, JJ (ed.). *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., pp. 1–19.
- ✦ Hoelzel P. 1992. *Molecular genetic analysis of populations*. Oxford IRL Press, Oxford.
- ✦ Hurst G., Jiggins F. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. R. Soc. B* 272: 1525–1534
- ✦ Kottelat, M. and J. Freyhof, *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. 2007 646 pp.
- ✦ Kottelat M. *Conspectus Cobitidum: an inventory of the loaches of the world (Teleostei: Cypriniformes: Cobitoidei)*. *Raffles B Zool.* 2012; Suppl. : 36: 1–199.
- ✦ Machordom A, Doadrio I. Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Mol Phylogenet Evol.* 2001; 18: 252–263. PMID:11161760

- ✦ Michaels G.S., Hauswirth W.W., Laipis P.J. 1982. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev. Biol.* 94: 246-251.
- ✦ Meyer A., Kocher TD., Basasibwaki P., Wilson AC. 1990. Monophyletic origin of Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*. 347:550-553.
- ✦ Meulenkamp J.E. (1985). Aspects of the Late Cenozoic evolution of the Aegean region. In: Stanley D.J., Wezel F.C. (eds), *Geological evolution of the Mediterranean basin*. Springer, New York, pp. 307–321
- ✦ Nelson, J. S., E. J. 2006 *Fishes of the World*, American Fisheries Society, John Wiley & Sons: (ISBN 0-471-25031-7
- ✦ Moore J., Willmer P. (1997). Convergent evolution in invertebrates. *Biol. Rev.* 72: 1–60.
- ✦ Pleines T., Jakob SS., Blattner FR. 2009. Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. *Plant. Syst. Evol.* 282: 281–294.
- ✦ Silva Jr., Bonatto SL., Holanda AJ., Ribeiro-Dos-Santos AK., Paixao AK., Goldman GH., Abe-Sandes K., Rodriguez-Delfin L., Barbosa M., Paco-Larson ML., Petzl-Erler ML., Valente V., Santos SE., Zago MA. 2002. Mitochondrial genome diversity of Native Americans supports a single early entry of founder populations into America. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 187-192.
- ✦ Sfenthourakis S., Legakis A. (2001). Hotspots of endemic terrestrial invertebrates in southern Greece. *Biodiversity and Conservation* 10: 1387– 1417.
- ✦ Staley JM. 2009. Universal species concept: pipe dream or a step toward unifying biology? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 1331- 1336.
- ✦ Steininger F.F., Rögl F. (1984). Paleogeography and palinspastic reconstruction of the Neogene of the Mediterranean and Paratethys. In: Dixon J.E., Robertson A.H.F. (eds), *The Geological Evolution of the Eastern Mediterranean*. Blackwell Scientific Publications, pp. 659–668.
- ✦ Vladykov V. Secondary sexual dimorphism in some Chinese cobitid fishes. *J Morphol.* 1935; 57: 275–302.
- ✦ Zhang DX., Hewitt G. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. *Insect. Mol. Biol.* 6:143-150.
- ✦ Zhao X., Li N., Guo W., Hu X., Liu Z., Gong G., Wang A., Feng J., Wu C. (2004). Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity* 93: 399–403.